

Aus der Medizinischen Klinik der Universität Tübingen

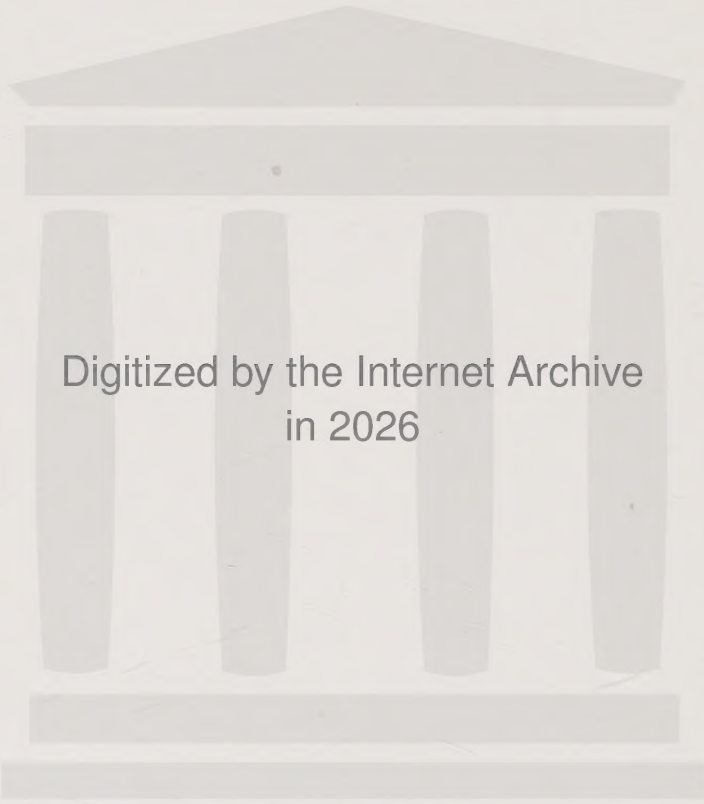
Direktor : Professor Dr. med. Dr. h. c. H. E. Bock

Eigenschaften des Formiat aktivierenden Enzyms
(Tetrahydrofolat-Formylase)
in normalen und pathologischen Blutzellen

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Hansjörg Sauer
aus Tübingen

1969
—



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus der Medizinischen Klinik der Universität Tübingen

Direktor: Professor Dr. med. Dr. h. c. H. E. Bock

Eigenschaften des Formiat aktivierenden Enzyms
(Tetrahydrofolat-Formylase)
in normalen und pathologischen Blutzellen

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Hansjörg Sauer
aus Tübingen

1969



Dekan: Professor Dr. J. Hirschmann

1. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. W. Wilmanns
(Professor Dr. H.E. Bock)
2. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. U. Feine

Herrn Oberarzt Privat-Dozent Dr. W.Wilmanns
bin ich zu großem Dank verpflichtet für die
freundliche Überlassung des Themas und die
Anleitung bei der Erarbeitung und Auswertung
der Ergebnisse.

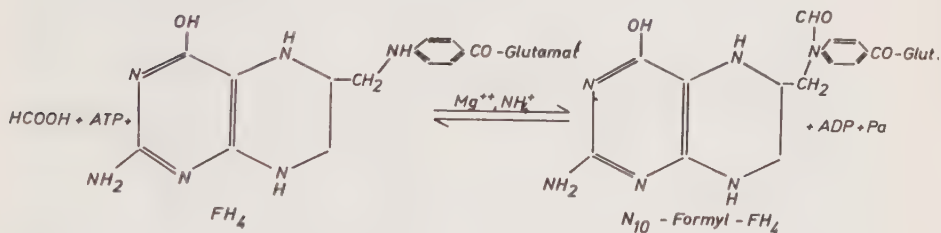
I.	Einleitung		1
II.	Methodik		5
	1. Zellisolierung und Enzymbereitung		5
	2. Herstellung von d,l-Tetrahydrofolsäure		6
	3. Bestimmung der Aktivität der Tetrahydrofolat-Formylase		6
	4. Bestimmung der MICHAELIS-MENTEN-Konstanten bei der Tetrahydrofolat-Formylase		9
	5. Anreicherung der Tetrahydrofolat-Formylase aus Erythrocyten		10
	6. Bestimmung des Proteingehaltes der Enzymlösung		12
	7. Bestimmung des Hämoglobingehaltes der Enzymlösung		14
	8. Statistik		14
III.	Ergebnisse		16
	A. Die spezifische Aktivität der Tetrahydrofolat-Formylase		16
	1. Abhängigkeit der Enzymaktivität vom pH des Inkubationsansatzes		16
	2. Abhängigkeit der Enzymaktivität von der verwendeten Enzymmenge		16
	3. Normalwerte der spezifischen Aktivität der Tetrahydrofolat-Formylase		18
	4. Abhängigkeit der Enzymaktivität von der Formiat-Konzentration im Ansatz und Bestimmung der MICHAELIS-MENTEN-Konstante für Formiat		19
	5. Abhängigkeit der Enzymaktivität von der ATP-Konzentration im Ansatz und Bestimmung der MICHAELIS-MENTEN-Konstante für ATP		20
	6. Abhängigkeit der Enzymaktivität von der d,l-FH ₄ -Konzentration im Ansatz und Bestimmung der MICHAELIS-MENTEN-Konstante für l-FH ₄		23
	7. Einfluß des ATP-regenerierenden Systems (PEP + PK) auf die Aktivität der Tetrahydrofolat-Formylase		25

8. Versuch zur Stabilisierung der Tetrahydrofolat-Formylase	 25
9. Anreicherung der Tetrahydrofolat-Formylase	 26
B. Beziehungen zwischen klinischen Daten, der Aktivität und der Kml-FH ₄ der Tetrahydrofolat-Formylase	 29
1. Die Aktivität des Formiat-aktivierenden Enzyms in Beziehung zu der LDH, den Reticulocyten und der Erythrocyten-Lebensdauer im peripheren Blut	 30
2. Die MICHAELIS-MENTEN-Konstante für l-FH ₄ bei der Tetrahydrofolat-Formylase-Reaktion in Beziehung zu der Reticulocytenzahl im peripheren Blut und der Erythrocyten-Lebensdauer	 33
3. Eigenschaften des Formiat-aktivierenden Enzyms in Beziehung zum Alter der Erythrocytenpopulation und der Reticulocytenzahl	 38
4. Enzymatische Formiataktivierung in verschieden alten Erythrocyten beim gleichen Patienten	 40
C. Hemmung der Aktivität der Tetrahydrofolat-Formylase durch den Purinantagonisten 6-Mercaptopurin und den Xanthinoxydasehemmer Allopurinol	 43
1. Beeinflussung der spezifischen Aktivität der Tetrahydrofolat-Formylase durch Allopurinol, 6-MP und durch die Kombination beider Stoffe	 43
2. Typen der Hemmung der Tetrahydrofolat-Formylase durch 6-Mercaptopurin gegenüber den drei Substraten der Enzymreaktion	 48
IV. Diskussion	 52
V. Zusammenfassung	 57
VI. Abkürzungsverzeichnis	 59
VII. Literaturverzeichnis	 60

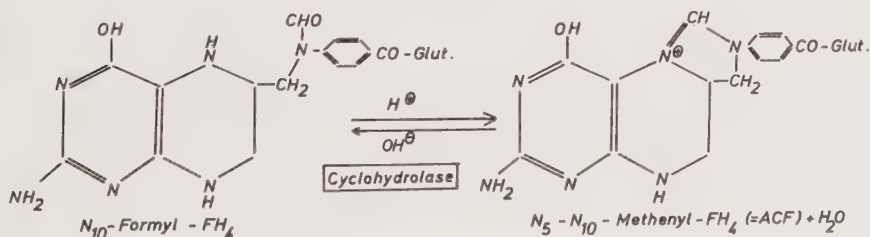
I. Einleitung

Die Reaktion des sog. Formiat-aktivierenden Enzyms - Synonyma dafür sind: Tetrahydrofolat-Formylase, N₁₀-Formyl-FH₄-Synthetase und nach der internationalen Nomenklatur Formiat:Tetrahydrofolat Ligase (ADP) E (6. 3. 43) - wurde erstmals von GREENBERG, JAENICKE und SILVERMANN beschrieben (15), der Mechanismus von WHITELEY, OSBORN und HUENNECKENS in *Micrococcus aerogenes* (30) und von JAENICKE und BRODE in Taubenleber (17) aufgeklärt. RABINOWITZ und PRICER gewannen das Enzym in kristalliner Form aus *Clostridium cylindrosporum* (24,25).

Tetrahydrofolat - Formylase
(N₁₀ - Formyl - FH₄ - Synthetase)



Gleichung 1



Gleichung 2

Die Eigenschaften des Enzyms in weißen Blutzellen wurden von WILMANNS und JAENICKE (31,33) sowie von BERTINO und Mitarb. (3,5) und von GRIGNANI und Mitarb. (16) bei verschiedenen Leukämieformen untersucht. Ergebnisse über die Enzymeigenschaften in Erythrocyten liegen von WILMANNS (34) bei Patienten mit paroxysmaler nächtlicher Hämoglobiurie und von BERTINO und Mitarb. (4) vor.

BERTINO (4) fand eine Erhöhung der Aktivität der Tetrahydrofolat-Formylase in Erythrocyten bei erhöhten Reticulocytenzahlen (Perniciosa, Sichelzellenanämie, hämolytische Anämie) im peripheren Blut. Weiterhin fand er bei Versuchen an verschiedenen Tierarten die höchsten Aktivitäten des Enzyms bei den Tieren mit der kürzesten Erythrocyten-Lebensdauer (Tab.1).

Tabelle 1

	Reticulocyten	Erythrocyten-	SA der Tetrahydro-
		Lebensdauer	folat-Formylase
	%	Tag	mpMol/h/mg Hb
Huhn	(kernhaltig)	30	282
Maus	3,1	22	773
Meerschweinchen	2,0	40	240
Ratte	2,0	58	147
Kaninchen	1,9	55	82
Schwein	1,5	62	53
Hund	0,6	100	32
Mensch	0,8	120	36

Diese Ergebnisse veranlaßten uns, die Eigenschaften des Enzyms in Erythrocyten unter besonderer Berücksichtigung der Reticulocytenzahlen im peripheren Blut und der Erythrocyten-Lebensdauer zu untersuchen und die Ergebnisse mit denen aus normalen und pathologischen Leukocyten zu vergleichen.

WILMANNS zeigte 1962 erstmals, daß die Tetrahydrofolat-Formylase durch 6-Mercaptopurin gehemmt wird (32). Auch

von UNGER und SILBER liegen Untersuchungen über die Hemmung durch diesen Purinantagonisten vor (29). In dieser Arbeit soll der Wirkungsmechanismus des 6-Mercaptopurins an aus Erythrocyten angereichertem Enzym und an Leukocytenenzym untersucht werden. Auch der Effekt von Allopurinol, das als Xanthinoxidasehemmer den Abbau von 6-MP verhindern soll (27,38), wird allein und in Kombination mit 6-MP untersucht.

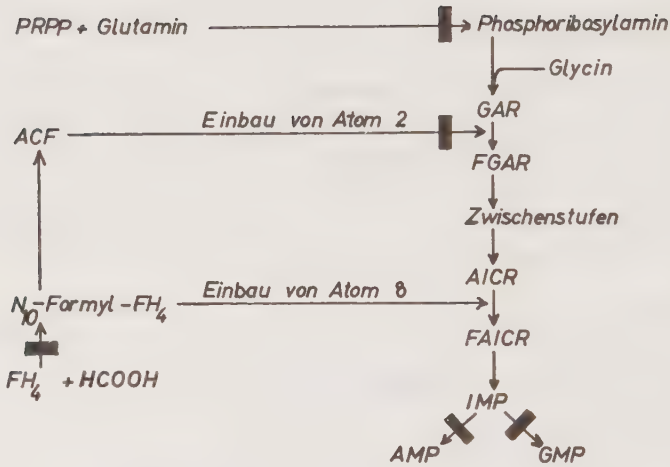
Die durch das Formiat-aktivierende Enzym gebildeten aktiven Einkohlenstoffeinheiten ("C₁"-Reste) dienen als Bausteine bei der de-novo-Synthese der Purinkörper. Sie bilden die Atome 2 und 8 des Puringerüsts. Durch die Hemmung der "C₁"-Aktivierung mit 6-MP wird somit auch die Purin-Synthese und damit die Nucleinsäure-Synthese gehemmt.

Weiterhin wird die Formylierung von Glycinamidribotid (GAR) zu Formylglycinamidribotid (FGAR) blockiert (7).

Andere cytotostatische Effekte des 6-MP beruhen auf einer Hemmung der Umwandlung von Inosinsäure in Adenylsäure und Guanylsäure (Literatur siehe bei (37)).

Die Hemmung der Methylen-FH₄-Dehydrogenase-Reaktion (32) führt ebenfalls zu einer Verkleinerung des Stoffwechsel-Pools der aktiven "C₁"-Reste.

Die Ribotidform des 6-MP hemmt die enzymatische Bildung von Phosphoribosylamin aus Glutamin und Phosphoribosylpyrophosphat (PRPP) als Analog zu IMP im Sinne eines negativen Rückkoppelungseffektes (21,22).



■ = Hemmung durch 6-MP

Abb.1: Purinnucleotidsynthese und ihre Beeinflussung durch 6-MP

II. Methodik

=====

1. Zellisolierung und Enzymbereitung

Erythrocyten:

5 ml venöses Blut wurden in 1 ml 5%iger Magnesium-Titriplex-III-Lösung aufgenommen. Nach 30 min Inkubation im Wasserbad bei 37°C wurden Plasma und Leukocyten als Überstand abgehoben. Alle folgenden Arbeiten wurden zwischen 0° und 3°C durchgeführt. Nach 10 min Zentrifugieren in der Servall Kühlzentrifuge RC-2 bei 480 g wurde wiederum der Überstand abgehoben und die sedimentierten Erythrocyten 3 mal in calciumfreier Ringer-Phosphat-Glukose-Lösung gewaschen. In der letzten Suspension wurden die Erythrocyten gezählt und außerdem die Leukocytenverunreinigung ermittelt. Das dritte Sediment aus dem Waschvorgang wurde dann mit so viel 0,001 m Kalium-Phosphatpuffer pH 7,5 cytolytisiert, daß in 0,1 ml des Lysates die Aktivität von 1×10^8 Erythrocyten vorhanden war. Nach 1 Std. Stehen bei 0°C wurden durch halbstündiges Zentrifugieren bei 34 800 g die Erythrocyten-Stromata abgetrennt. Der Überstand wurde als Enzymlösung verwendet.

Leukocyten (35):

40 ml venöses Blut wurden in 4 ml 5%iger Magnesium-Titriplex-Lösung aufgenommen. Nach der Inkubation (wie oben) wurde der Plasma- und Leukocytenüberstand 10 min bei 480 g in der Kühlzentrifuge zentrifugiert und das Sediment zur isolierten Zerstörung der Erythrocyten 3 min lang mit 0,83%iger Ammoniumchloridlösung versetzt. Dann wurde - wie oben - gewaschen und cytolytisiert. Dabei wurde aber die Aktivität auf nur 1×10^7 Leukocyten in 0,1 ml Enzymlösung eingestellt. Die Erythrocyten und die Leukocyten wurden nach Verdünnung mit HAYEM'scher bzw. mit TUEBK'scher Lösung in der Zählkammer nach NEUBAUER gezählt.

2. Herstellung von d,l-Tetrahydrofolsäure (17,23)

60 mg Platinoxid wurden in einem Hydrierkolben mit 20 ml Eisessig und Wasserstoff zu elementarem Platin reduziert. Dann wurden 200 mg Folsäure zugegeben und ca. 2 Std. unter Wasserstoffdruck weitergeschüttelt. Die dabei ausfallende Tetrahydrofolsäure wurde nach dreimaligem Waschen in peroxidfreiem Diäthyläther und nach Trocknung bei -10°C im Exsiccator aufbewahrt, wo sie über Wochen haltbar blieb.

3. Bestimmung der Aktivität der Tetrahydrofolat-Formylase (37)

Die Inkubationsansätze enthielten:

0,1	m Magnesium-Titriplex-III	0,1	ml = 10 μMol
0,2	m Magnesiumchlorid	0,05	ml = 10 μMol
1,0	m Tris-Puffer pH 7,0	0,1	ml = 100 μMol
0,2	m Ammoniumchlorid	0,05	ml = 10 μMol
0,2	m Natriumformiat	0,05	ml = 10 μMol
0,05	m Adenosintriphosphat	0,05	ml = 2,5 μMol
0,3	m Mercaptoäthanol	0,1	ml = 30 μMol
0,1	m Phosphoenolpyruvat	0,025	ml = 2,5 μMol
	Pyruvat-Kinase	0,1	ml = 5 μg
	aus Leukocyten	0,1	ml = 10^7 Zellen
Enzymlösung	bzw.		
	aus Erythrocyten	0,1	ml = 10^8 Zellen
0,0135	m d,l-Tetrahydrofolsäure	0,1	ml = 1,35 μMol = 600 μg

Die ATP-Lösung wurde mit 4 n KOH neutralisiert. Die Pyruvat-Kinase wurde in 2,1 m Ammoniumsulfatlösung pH 6,0 gelöst. Die d,l-FH₄ wurde unmittelbar vor Gebrauch in 9 Teilen 0,05 m KHCO₃ und in 1 Teil 0,3 m Mercaptoäthanol gelöst.

Die Ansätze wurden mit Aqua bidest. auf 1 ml aufgefüllt.

Die Leerwerte wurden aus entsprechenden Ansätzen - ohne das Enzym - ermittelt. Sofort nach Zugabe der FH₄ zu den Ansätzen wurden 0,4 ml des Ansatzes in 1,6 ml 0,625 m HClO₄ gegeben = Null-Minutenwert.

Der Rest der Ansätze wurde mit etwas Petroleumbenzin überschichtet und 1 Std. bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Dann wurde die Reaktion unterbrochen, indem man wieder 0,4 ml des Ansatzes in 1,6 ml 0,625 M HClO₄ einpipettierte = 60-Minutenwert.

Nach 15 min Enteiweißen und scharfem Abzentrifugieren wurde in Küvetten von 1 cm Durchmesser im Photometer bei einer Wellenlänge von 355 mμ die Extinktionsdifferenz zwischen dem 0'- und dem 60'-Wert bestimmt. Durch Abzug der Extinktionsdifferenz der Leerwerte erhielt man ΔE. Durch die Ansäuerung mit HClO₄ wurde die enzymatisch gebildete N₁₀-Formyl-PH₄ in den Anhydrocitrovorum-Faktor umgewandelt, dessen molare Extinktion bei 355 mμ 25 100 beträgt. Daraus läßt sich die in der Stunde gebildete Menge ACF berechnen.

Die spezifische Aktivität der Tetrahydrofolat-Formylase ist also:

$$SA = \frac{\Delta E \times 10^3 \times 5}{25} \text{ } \mu\text{Mol/h/} 10^8 \text{ Erythrocyten} \\ \text{bzw. } 10^7 \text{ Leukocyten}$$

Diese Formel gilt nur, wenn die Zellzahl in der Enzymlösung genau auf 1 x 10⁸ bzw. auf 1 x 10⁷ eingestellt ist. Andernfalls wird der Wert korrigiert, indem man durch den Faktor dividiert, um den die Zellzahl von 1 x 10⁸ bzw. 1 x 10⁷ abweicht.

$$SA = \frac{\Delta E \times 10^3 \times 5}{25 \times \text{mg Prot.}} \text{ } \mu\text{Mol/h/mg Protein}$$

$$SA = \frac{\Delta E \times 10^3 \times 5}{25 \times \text{mg Hb}} \text{ } \mu\text{Mol/h/mg Hb}$$

Bei 5 Patienten wurde der Leukocytenanteil im Verhältnis zu den Erythrocyten ermittelt, um zu prüfen, welchen Einfluß Verunreinigungen durch Leukocyten auf die Aktivität des Enzyms im Erythrocyten-Cytolysat haben. Die folgende Tabelle 2 zeigt, daß 0,09 bis 0,13% der Zellen Leukocyten waren, und daß ihr Anteil an der festgestellten Aktivität im Cytolysat zwischen 0,1 und 0,9% lag.

Tabelle 2: Bedeutung von Leukozytenver unreinigung für die Aktivität der Tetrahydrofolat-Formylase in Hämolysaten

Pat.	Zellen im Inkubationsansatz (1 ml) Eryth. x 10 ⁸	Leuko. x 10 ⁵	Leukozyten- ver unreinigung in %	Enzymaktivität (µMol/h) Ges. Hämolysat	Leuko.-Ver unreinigung
1	1,52	1,5	0,1	168	1,5 (0,89%)
2	1,08	1,3	0,12	1 000	1,3 (0,13%)
3	0,7	0,9	0,13	319	0,9 (0,24%)
4	0,5	0,3	0,06	298	0,3 (0,1 %)
5	0,8	0,7	0,09	282	0,7 (0,25%)

Werte für Leukozyten berechnet nach der mittleren Enzymaktivität in Leukozyten von 100 µMol/h/10⁷ Zellen.

Auf Grund dieses geringen Einflusses der zurückbleibenden Leukocyten auf die Gesamtaktivität im Ansatz erscheint für diese Untersuchungen eine noch exaktere Abtrennung der Leukocyten von den Erythrocyten nach der von BUSCH und PELZ (9) angegebenen Baumwollmethode als unnötig.

4. Bestimmung der MICHAELIS-MENTEN-Konstanten bei der Tetrahydrofolat-Formylase

Bei linearem Verlauf der Enzymreaktion mit optimaler Konzentration der übrigen Substrate über 60 min (4) waren die Ansätze und das Verfahren wie bei der Aktivitätsbestimmung. Es wurde die Konzentration der d,l-FH₄ folgendermaßen variiert:

µg d,l-FH ₄	=	µMol d,l-FH ₄ im Ansatz
150		0,34
300		0,68
450		1,02
600		1,36
1 200		2,72

Die Bestimmung der K_m erfolgte aus einer graphischen Darstellung der Ergebnisse (Abb.2) (11), bei der auf der Abszisse ¹/FH₄-Konzentration in ¹/mMol/Ltr. = ¹/S und auf der Ordinate ¹/V = ¹/mMol ACF/Ltr/h aufgetragen wurde. Der Abszissenabschnitt stellte dann den Wert -1/K_m_{d,l-FH₄} dar. Aus diesem Wert ließ sich die K_m_{d,l-FH₄} (in mMol/Ltr) berechnen. Division durch 2 ergab den Wert für K_m_{l-FH₄}.

Die K_m von ATP und Formiat wurde prinzipiell nach dem gleichen Verfahren ermittelt. Dabei wurden die Konzentrationen von ATP und Formiat wie folgt variiert:

ATP: µMol im Ansatz	Formiat: µMol im Ansatz
0,5	1
1,25	2,5
2,5	5
	10
	20

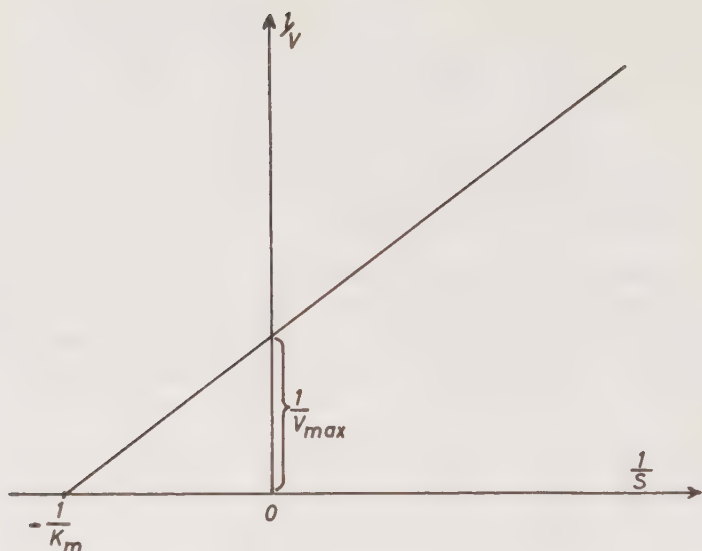


Abb.2: Ermittlung der K_m aus einer graphischen Darstellung der Werte.

S = Konzentration des Substrates, für das die K_m bestimmt werden soll.

V = Reaktionsgeschwindigkeit
= Substratumsatz/Ltr/h.

5. Anreicherung der Tetrahydrofolat-Formylase aus Erythrocyten (in Anlehnung an BERTINO (4))

Aus 40 ml venösem Blut wurden - wie S.5 beschrieben - die Erythrocyten ausgewaschen und cytolysiert. Es wurde so viel 0,001 m Kalium-Phosphatpuffer pH 7,5 zugegeben, daß 105 ml Enzymlösung entstanden. 5 ml dieses einfachen Lysates wurden als Fraktion I zurückbehalten. Zu den restlichen 100 ml wurden 20,5 Gramm festes Ammoniumsulfat langsam zugerührt. Nach Zentrifugieren bildete der Überstand

die Fraktion II. Das 0 - 28% gesättigte Präzipitat wurde 3mal in 33%iger Ammoniumsulfatlösung pH 8,0 gewaschen und in 13,5 ml 0,003 m Kalium-Phosphatpuffer pH 7,5 suspendiert. Nach Zentrifugieren bildete der Überstand die Fraktion III. 13 ml von III wurden dann 3 Std. gegen Aqua dest. dialysiert. Man erhielt die Fraktion IV.

10 ml von IV wurden nochmals fraktioniert: Nach Zugabe von 6,67 ml einer 100% gesättigten Ammoniumsulfatlösung pH 8,0 erhielt man durch Zentrifugieren eine 0 - 40% gesättigte Fraktion = VI als Präzipitat. Der Überstand bildete die Fraktion V. Nach weiterer Zugabe von 3,33 ml einer 100% gesättigten Ammoniumsulfatlösung pH 8,0 zu 10 ml von V erhielt man durch Zentrifugieren eine 40 - 55% gesättigte Fraktion = VIII als Präzipitat. Der Überstand bildete Fraktion VII.

Die Fraktion II wurde weiter zerlegt, nachdem sich die Aktivität des Enzyms in ihr als hoch erwiesen hatte: Zu 50 ml der Fraktion II wurden 10 ml 100% gesättigte Ammoniumsulfatlösung pH 8,0 zugegeben. Durch Zentrifugieren erhielt man eine 28 - 40% gesättigte Fraktion = X als Präzipitat. Der Überstand bildete Fraktion IX.

Bei einem zweiten Versuch wurde die Fraktion IX zusätzlich aufgespalten:

Zu 50 ml von IX wurden 16,7 ml 100% gesättigte Ammoniumsulfatlösung pH 8,0 zugegeben. Durch Zentrifugieren erhielt man eine 40 - 55% gesättigte Fraktion = XII als Präzipitat. Der Überstand bildete die Fraktion XI. Alle Schritte des Anreicherungs Vorganges wurden bei 0 - 4°C ausgeführt. Zentrifugiert wurde jeweils bei 34 800 g in der Servall-Kühlzentrifuge RC-2.

Die Präzipitate wurden entsprechend ihrer Sättigung mit Ammoniumsulfatlösung pH 8,0 3 mal gewaschen. Die Präzipitate behielten bei Aufbewahrung bei -10°C über mindestens eine Woche ihre volle Aktivität.

Die Wiederherstellung der Aktivität in den Präzipitaten erfolgte durch Auflösen in 0,05 m Tris-Puffer pH 8,0. Diese Enzymlösung blieb höchstens 2 Tage stabil.

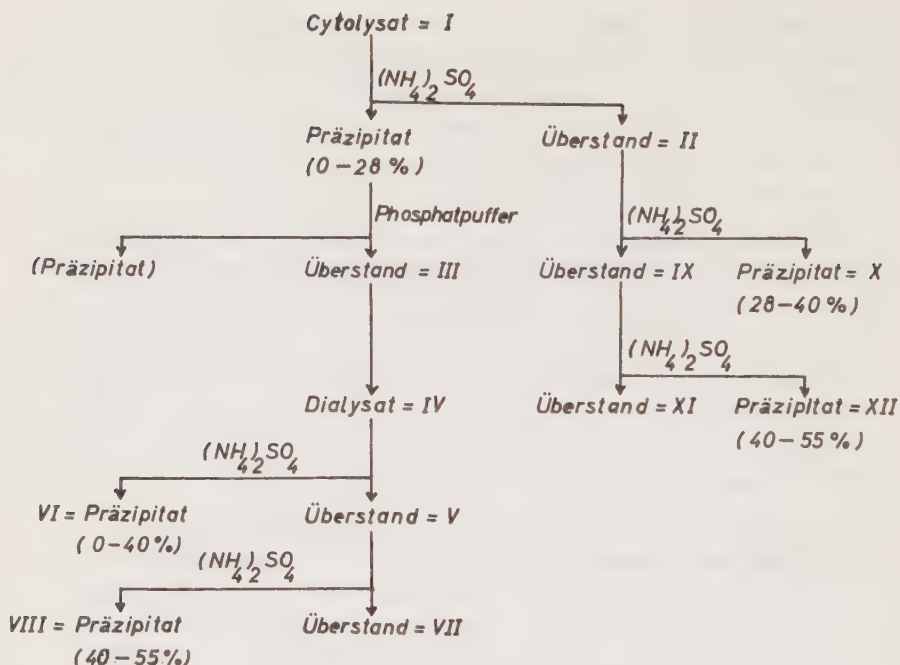


Abb. 3: Fraktionierungsschema

6. Bestimmung des Proteingehaltes der Enzymlösung nach BÜCHER (8)

BÜCHER-Lösung:

2 Teile 1%ige Ammoniumsulfatlösung

+ 1 Teil 3 m Trichloressigsäure

Mit Hilfe von 0,05%iger Humanalbuminlösung wurde eine Eichkurve ermittelt: Die entsprechende Menge Humanalbuminlösung, die 50, 100, 150 oder 200 µg Protein enthielt, wurde mit Aqua bidest. auf 1 ml und dann mit BÜCHER-Lösung auf 3 ml aufgefüllt. Nach 20minütigem Stehen bei Zimmertemperatur wurde im Photometer bei 546 mµ die Extinktion gemessen. Zur Darstellung der Eichkurve wurde auf der Abszisse die

Proteinmenge und auf der Ordinate die Extinktion gegenüber einem Leerwert ohne Proteinlösung aufgetragen (Abb.4).

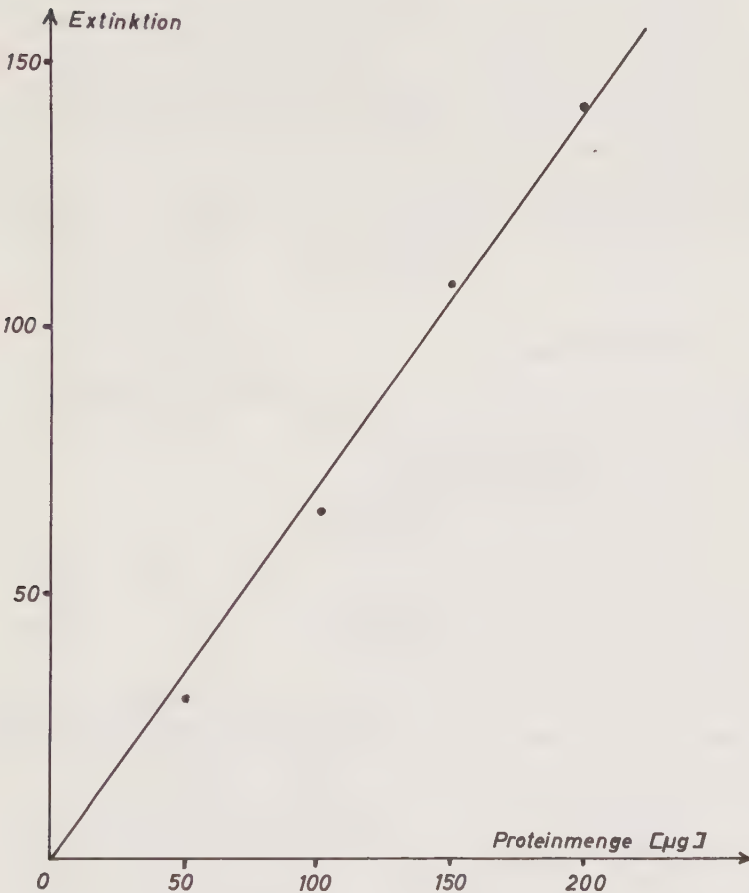


Abb.4: Eichkurve zur Proteinbestimmung

Zur Proteinbestimmung in Erythrocytenenzym wurde dieses 1:100 verdünnt und dann der Proteingehalt in 0,1 ml der Lösung bestimmt. Bei der Bestimmung in Leukocytenenzym wurden 0,2 ml unverdünnte Enzymlösung verwendet. Nach Ab-

lesen des Proteingehaltes aus der Kurve wurden die Werte auf mg Protein/0,1 ml unverdünnter Enzymlösung umgerechnet.

7. Bestimmung des Hämoglobingehaltes der Enzymlösung

Die Bestimmung erfolgte nach der Cyanhämoglobin-Methode. 0,02 ml der Enzymlösung wurden in 5 ml Kaliumferricyanidlösung gegeben. Nach 20 min wurde im Photometer die Extinktion bei 546 mμ gemessen. Durch Multiplikation des Extinktionswertes mit 36 ergab sich die Hämoglobinkonzentration in mg Hb/0,1 ml Enzymlösung.

8. Statistik (10)

Um den Zusammenhang zweier Größen zu prüfen, wurde der Korrelationskoeffizient r berechnet:

$$r = \frac{\text{Kovarianz}_{x,y}}{\sqrt{(\text{Varianz}_x) \cdot (\text{Varianz}_y)}}$$
$$r = \frac{\sum(x - \bar{x}) \cdot (y - \bar{y})}{\sqrt{\sum(x - \bar{x})^2 \cdot \sum(y - \bar{y})^2}}$$

Die Zufallshöchstwerte für r bei einer bestimmten Stichprobenzahl und einer bestimmten Überschreitungswahrscheinlichkeit wurden aus Tabellen entnommen (11).

Die Berechnung der Regressionsgeraden $y = a + bx$ erfolgte nach folgenden Formeln:

$$b = \frac{\sum(x - \bar{x}) \cdot (y - \bar{y})}{\sum(x - \bar{x})^2} = \text{Steigung der Geraden}$$

$$a = \bar{y} - b\bar{x} = \text{Lage der Geraden.}$$

Für die Untersuchungen in Erythrocyten wurden Patienten genommen, bei denen auf Grund der unterschiedlichsten Erkrankungen die Lebensdauer der Erythrocyten mit ^{51}Cr

bestimmt wurde^{*)}. Als Normalfälle dienten dabei Patienten, bei denen die Erythrocyten-Lebensdauer im Normbereich lag und die auch sonst keinen Anhalt für eine hämatologische Erkrankung boten. Für die Untersuchungen in Leukocyten wurden Patienten mit akuten und chronischen Leukosen genommen. Die Normalwerte wurden hier von Patienten gewonnen, die eine reaktive Leukocytose bei einer nicht hämatologischen Erkrankung zeigten.

*) Die Bestimmung der Erythrocyten-Lebensdauer erfolgte nach der ⁵¹Cr-Halbwertszeit-Methode. Ich danke Herrn Dr. Krebs und Herrn Dr. Gelinsky für die freundliche Überlassung ihrer Untersuchungsergebnisse.

III. Ergebnisse

A. Die spezifische Aktivität der Tetrahydrofolat-Formylase

1. Abhängigkeit der Enzymaktivität vom pH des Inkubationsansatzes

In dem unter Methodik beschriebenen Ansatz zur Bestimmung der Aktivität der Tetrahydrofolat-Formylase wurde das pH des Tris-Puffers variiert. Dabei ergab sich bei einem Anstieg des pH von 6,7 auf 7,5 nur eine geringe Schwankung in der Aktivität des Enzyms, die ein geringes Maximum bei pH 7,0 erkennen ließ (Tab.3). Die Ergebnisse waren bei normalen und pathologischen Erythrocyten und Leukocyten dieselben.

Tabelle 3: Einfluß des pH auf die Aktivität der Tetrahydrofolat-Formylase

pH	SA:µMol/h/10 ⁷ Zellen		
	normale Erythrocyten	hämolytische Anämie	Leukocyten
6,7	8,1	49,2	
7,0	8,3	51,1	97
7,2	8,0	50,4	
7,5	7,2	49,6	91

2. Abhängigkeit der Enzymaktivität von der verwendeten Enzymmenge

Bei der Verwendung von Leukocytenenzym fand sich ein linearer Anstieg der Bildung von Anhydrocitrovorum-Faktor mit der Zunahme der eingesetzten Enzymmenge (Abb.5).

Bei Erythrocytenenzym war der Anstieg nur im Bereich von relativ niedrigen Proteinkonzentrationen im Ansatz - die aber dennoch ungefähr das 10-fache der Ansätze mit Leuko-

cytenenzym betrugten - linear. Beim Einsatz größerer Enzymmengen nahm die Bildung von ACF nur noch im Sinne einer Exponentialfunktion zu (Abb.5).

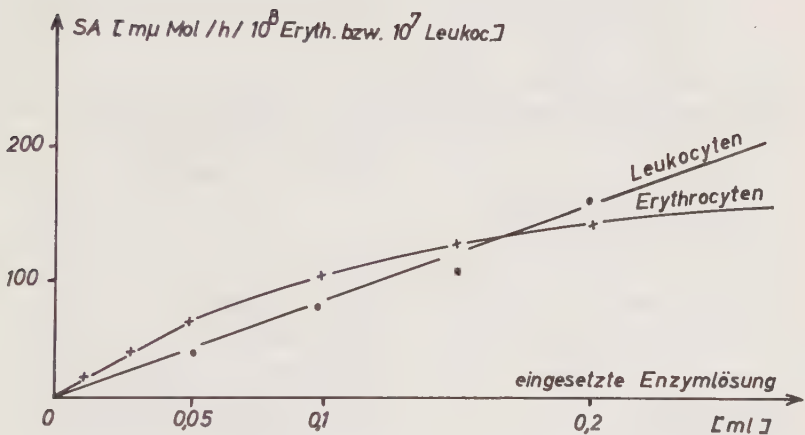


Abb.5: Abhängigkeit der Aktivität der Tetrahydrofolat-Formylase von der Enzymmenge

Der Grund für diese relative Abnahme der Enzymaktivität wurde nicht weiter untersucht. Es besteht die Möglichkeit, daß bei den hohen Proteinkonzentrationen im Ansatz irgend ein Hemmstoff mit zugegeben wird, der bei höherer Konzentration auch eine stärkere Hemmwirkung entfaltet. Oder es laufen so viele andere enzymatische Reaktionen parallel, daß die Tetrahydrofolat-Formylase-Reaktion durch ein noch unbekanntes Produkt aus diesen Reaktionen gehemmt wird (z.B. durch ADP (18)). Vielleicht handelt es sich auch um einen Einfluß der Tetrahydrofolat-Deacylase, die einen Teil der entstandenen Formyl-FH₄ wieder in Formiat und

FM₄ spaltet. Ein zu starker Substratverbrauch liegt nicht vor, da dem Ansatz alle Substrate im Überschuß zugegeben wurden.

Die Versuche wurden dann zur praktischen Durchführung so standardisiert, daß im Ansatz immer ungefähr dieselbe Menge Enzym vorhanden war. Dabei lagen die Enzymkonzentrationen noch im linearen Bereich der Kurve.

3. Normalwerte der Aktivität der Tetrahydrofolat-Formylase

Unter Berücksichtigung der Ergebnisse aus 1. und 2. ergaben sich aus mehreren Versuchen folgende Normalwerte:

Tabelle 4: Normalwerte der Aktivität der Tetrahydrofolat-Formylase

	N	SA
Erythrocyten	16	3-15 mμMol/h/10 ⁷ Zellen 2-10 mμMol/h/mg Protein 20-50 mμMol/h/mg Hb
Leukocyten (Leukocytose bei Herzinfarkt)	1	120 mμMol/h/10 ⁷ Zellen 250 mμMol/h/mg Protein

Entsprechende Ergebnisse finden sich in der Literatur:

BERTINO (4):

Erythrocyten : 19-49 mμMol/h/mg Hb

WILMANN (36):

Erythrocyten N=10: 5 mμMol/h/10⁷Zellen

WILMANN (37):

normale periph. Leuko. N=29: 22±15 mμMol/h/10⁷Zellen

normale Knochenmarkzellen N=16: 51±26 mμMol/h/10⁷Zellen

4. Abhängigkeit der Enzymaktivität von der Formiat-Konzentration im Ansatz und Bestimmung der MICHAELIS-MENTEN-Konstante für Formiat

In dem unter Methodik beschriebenen Ansatz zur Bestimmung der SA der Tetrahydrofolat-Formylase wurde die Formiat-Konzentration variiert (Abb.6a) (vgl.S.9). Aus der graphischen Darstellung (Abb.6b) der Untersuchungsergebnisse ließen sich folgende mittleren K_m -Werte für Formiat berechnen:

Tabelle 5: K_{mCOOH} bei der Tetrahydrofolat-Formylase

	N	K_{mCOOH} (10^{-3} Mol/Ltr.)
Erythrocyten	3	2,5
Leukocyten	3	5,7

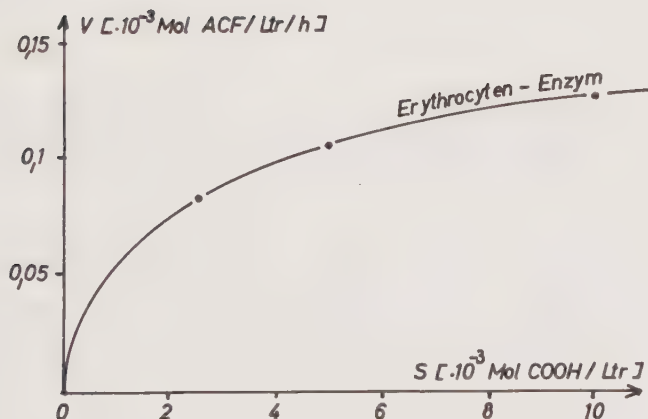


Abb.6a: Abhängigkeit der Aktivität der Formyl-FH₄-Synthetase in Erythrocyten von der Formiat-Konzentration

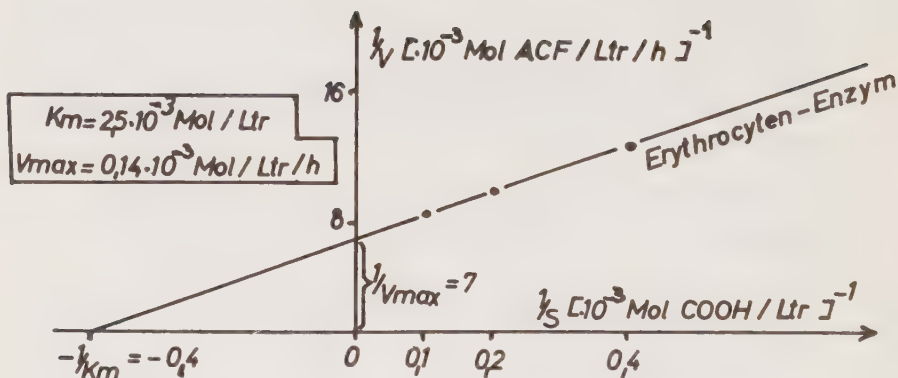


Abb.6b: Ermittlung der K_{mCOOH} bei der Tetrahydrofolat-Formylase in Erythrocyten

Einen entsprechenden Wert für Erythrocyten fand BERTINO (4) mit $2,1 \times 10^{-3} \text{ Mol/Ltr}$. UNGER und SILBER (29) fanden für Leucocyten bei chron. myeloischer Leukämie einen Wert von $5,5 \times 10^{-3} \text{ Mol/Ltr}$.

5. Abhängigkeit der Enzymaktivität von der ATP-Konzentration im Ansatz und Bestimmung der MICHAELIS-MENTEN-Konstante für ATP

Diese Versuche erfolgten in einem Inkubationsansatz, der das ATP-regenerierende System, bestehend aus PEP und PK, nicht enthielt. Dadurch wurde eine Verfälschung der Ergebnisse durch neu gebildetes ATP vermieden. Die ATP-Konzentration wurde wie auf S.9 beschrieben variiert (Abb.7a). Die Ermittlung der K_m für ATP erfolgte wie oben (vergl. S.9) (Abb.7b).

Aus verschiedenen Versuchen ergaben sich folgende Durchschnittswerte für die K_m von ATP:

Tabelle 6: K_{mATP} bei der Tetrahydrofolat-Formylase

	N	$K_{mATP} (10^{-4} \text{ Mol/Ltr})$
Erythrocyten	3 (angereichertes Enzym)	4,6
Leukocyten	3 (2 chron. Myelosen, davon 1 mit Myeloblastenschub und 1 Osteomyelosklerose mit Myeloblastenschub)	5,2

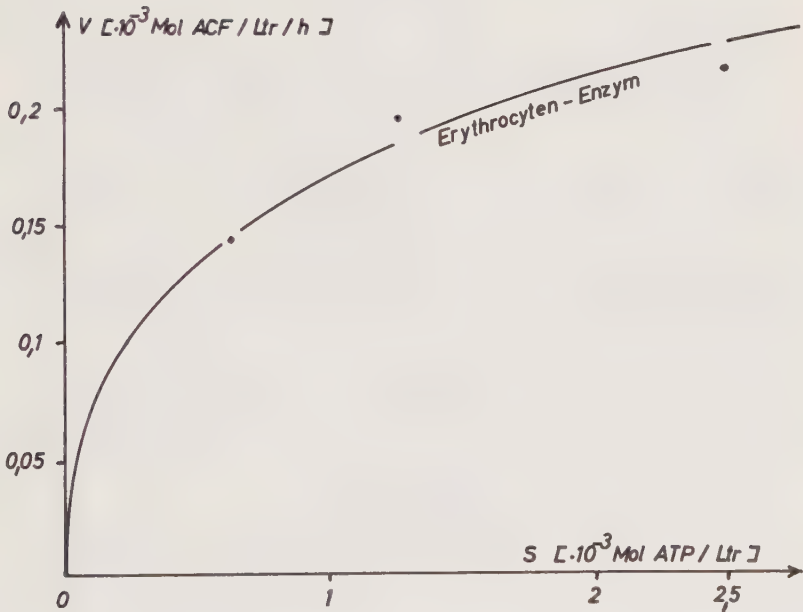


Abb. 7a: Abhängigkeit der Aktivität der Tetrahydrofolat-Formylase in Erythrocyten von der ATP-Konzentration.

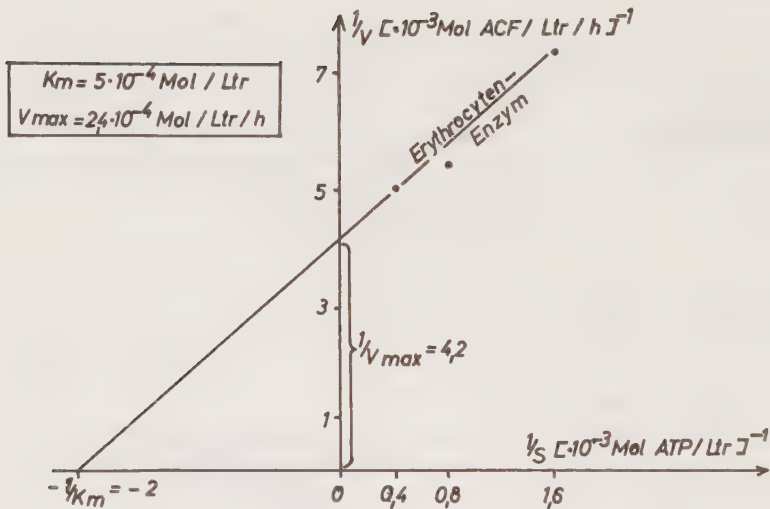


Abb.7b: Ermittlung der K_{mATP} bei der Tetrahydrofolat-Formylase in Erythrocyten

Von verschiedenen Autoren wurden ähnliche Ergebnisse gefunden (29,4,18):

UNGER und SILBER:	chron. Myelose	: $9,0 \times 10^{-4} \text{ Mol/Ltr}$
	Rattenleber	: $4,6 \times 10^{-4} \text{ Mol/Ltr}$
BERTINO u.Mitarb.:	Erythrocyten	: $1,5 \times 10^{-5} \text{ Mol/Ltr}$
JOYCE und HIMES:	kristallines Enzym aus Clo- stridium cylin- drosporum	: $2,0 \times 10^{-4} \text{ Mol/Ltr}$

6. Abhängigkeit der Enzymaktivität von der d,l-FH₄-Konzentration im Ansatz und Bestimmung der MICHAELIS-MENTEN-Konstante für l-FH₄

Nach der beschriebenen Methode (S.9) wurde folgender Normalwert für die Km bestimmt:

Tabelle 7: Km_{l-FH₄} bei der Tetrahydrofolat-Formylase

	N	Km _{l-FH₄} (10 ⁻⁴ Mol/Ltr)
Erythrocyten	10	3±1,5
Leukocyten	1	5

Dazu der Vergleich mit Ergebnissen anderer Autoren (29,4, 18,34):

UNGER und SILBER:	Rattenleber	:	3,6 x 10 ⁻⁴ Mol/Ltr
	akute Leukose	:	13,6 x 10 ⁻⁴ Mol/Ltr
BERTINO u.Mitarb.:	Erythrocyten	:	1,1 x 10 ⁻⁴ Mol/Ltr
JOYCE und HIMES:	kristallines Enzym aus Clostridium Cylindrosporum	:	2,1-4,9 x 10 ⁻⁴ Mol/Ltr
WILMANNs:	Erythrocyten	:	2,9 x 10 ⁻⁴ Mol/Ltr
	Sternalmark	:	1,5 x 10 ⁻⁴ Mol/Ltr

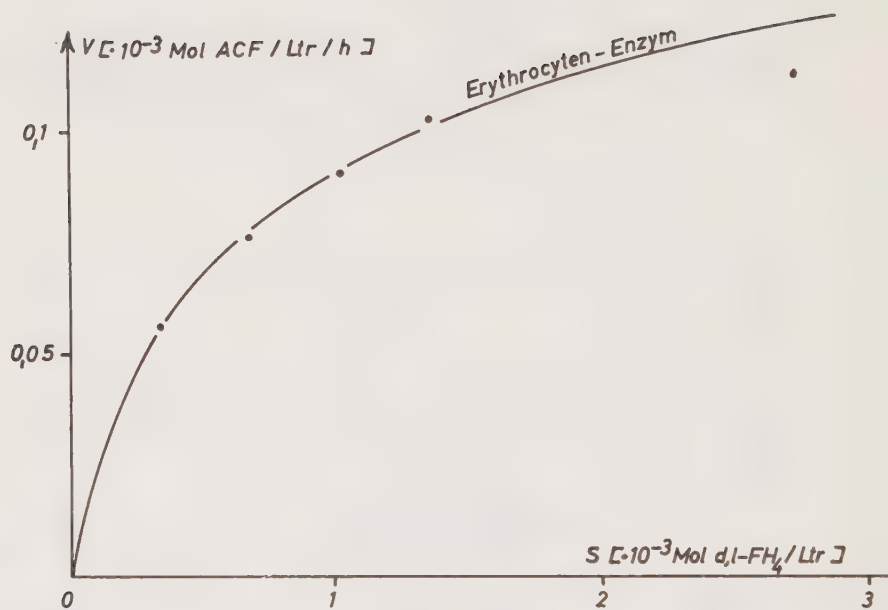


Abb.8a: Abhängigkeit der Aktivität der Tetrahydrofolat-Formylase in Erythrocyten von der d,l-FH₄-Konzentration

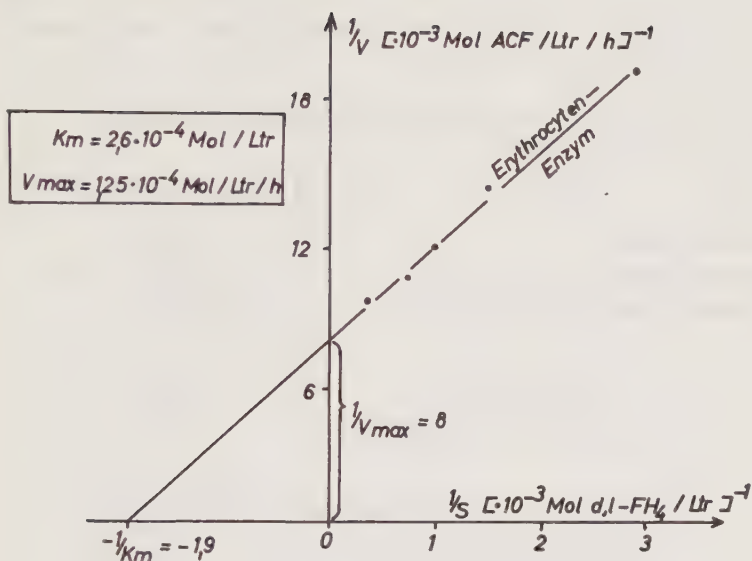


Abb.8b: Ermittlung der K_{m1-FH_4} bei der Tetrahydrofolat-Formylase in Erythrocyten

7. Einfluß des ATP-regenerierenden Systems (PEP + PK) auf die Aktivität der Tetrahydrofolat-Formylase

Die Aktivität des Enzyms betrug ohne das ATP-regenerierende System im Ansatz nur etwa 35 - 40% der Aktivität, die erreicht wurde, wenn laufend ADP zu ATP regeneriert wird.

8. Versuch zur Stabilisierung der Tetrahydrofolat-Formylase

Entsprechend Angaben von UNGER und SILBER (29) wurde der frischen Enzymlösung so viel feste D-Glukose zugegeben,

daß eine 10%ige Lösung entstand. Dadurch blieb die Aktivität im Rohhomogenat über 24 Std. voll erhalten, bei Aufbewahrung bei +4°C genau so wie bei -4°C. Es zeigte sich sogar eine geringe Erhöhung der Aktivität nach dem Glukosezusatz (Tab.8):

Tabelle 8: Stabilisierung der Tetrahydrofolat-Formylase mit Glukose

	SA: $\mu\text{Mol/h}/10^8 \text{Eryth.}$	
frisches Enzym	82	= 100%
frisches Enzym + 10% Glukose	90	= 110%
Glukose-Enzym nach 24 Std	95	= 116%
nach 48 Std	41	= 50%
Enzym ohne Glukosezusatz		
nach 24 Std	33	= 40%
nach 48 Std	21	= 25%

9. Anreicherung der Tetrahydrofolat-Formylase (in Anlehnung an BERTINO (4))

Die einzelnen Fraktionen sind im methodischen Teil beschrieben (S.10-12). Das Ergebnis der Anreicherungsversuche ist in Tabelle 9 dargestellt. Hier fällt vor allem der hohe Wert der K_{m1-PH_4} in der XII.Fraktion bei der Patientin mit autoimmunhämolytischer Anämie auf. Er beträgt etwa das 6-fache der übrigen Fraktionen. Daß diese Erhöhung der K_m durch Hemmfaktoren bedingt wird, ist unwahrscheinlich, da es sich um eine hoch angereicherte Fraktion handelt. Die gleichartige, auf Isoenzym verdächtige Fraktion wurde bei einer Patientin mit Sphärocytose nicht untersucht.

Bei der Fraktion X aus Versuch 2 wurde die Auswirkung einer Erhöhung der ADP-Konzentration auf die Aktivität der Tetrahydrofolat-Formylase untersucht. Die Ergebnisse (Tab.10) zeigen eine Abhängigkeit der Enzymaktivität von der ATP- und ADP-Konzentration im Ansatz. Die Aktivität des Formiat-aktivierenden Enzyms war deutlich erniedrigt,

Tabelle 9: Anreicherung der Tetrahydrofolat-Formylase aus Hämolysat

Versuch 1: bei Sphärocytose (Schn., I. ♀, 19 J.)

Versuch 2: bei autoimmunhämolytischer Anämie (Schn., A. ♀, 65 J.)

Fraktion	SA: mpMol/h/mg Prot.	Anreicherungs- faktor		Km ₁ -FH ₄ x 10 ⁻⁴ /Mol	
		Vers.1	Vers.2	Vers.1	Vers.2
I Hämolysat	22	38			6,8
II 0-28% (NH ₄) ₂ SO ₄ , Überstand	38	64			
III Präzipitat von II gelöst in 0,003 m K-Phosphatpuffer pH 7,5	225	387	10	10	
IV Dialysat von III	260	333	12	9	
V 0-40% (NH ₄) ₂ SO ₄ zu IV, Überstand	528	600	24	16	
VI Präzipitat von V	19	0			
VII 40-55% (NH ₄) ₂ SO ₄ zu V, Überstand	234	216	10	6	
VIII Präzipitat von VII	5 720	10 220	260	275	2,25 5,9
IX 28-40% (NH ₄) ₂ SO ₄ zu II, Überstand	45	46			
X Präzipitat von IX	577	4 200	27	110	6,8 6,4
XI 40-55% (NH ₄) ₂ SO ₄ zu IX, Überstand		10			
XII Präzipitat von XI		7 250		190	<u>34,5</u>

wenn das ATP-regenerierende System fehlte (vergl. S.25).
Der Zusatz von ADP bewirkte eine weitere Hemmung der Enzym-
aktivität.

Tabelle 10: Bedeutung eines ATP-regenerierenden Systems
(PEP + PK) für die Aktivität der Tetrahydro-
folat-Formylase. Hemmung des Enzyms durch ADP.
Untersuchungen mit Fraktion X (Versuch 2)
aus Tab.9

mit PEP + PK	ADP (10^{-3} Mol)	SA: μ Mol/h/mg Prot.
+	-	4 200
-	-	2 500
-	2,5	1 625
-	5	1 160

B. Beziehungen zwischen klinischen Daten, der Aktivität und der Km_1 - PH_4 der Tetrahydrofolat-Formylase

Aus der Literatur sind vor allem Ergebnisse von Untersuchungen bei Leukosen bekannt (3,5,16,31,33). Da in diesen Fällen eine Erhöhung der Aktivität der Tetrahydrofolat-Formylase gefunden wurde, wird nun untersucht, ob sich das Enzym in jugendlichen roten Blutkörperchen und deren Vorstufen genau so verhält. Es werden also zum größten Teil hämolytische Anämien mit erhöhten Reticulocytenzahlen im peripheren Blut zur Untersuchung gelangen.

Bei Erkrankungen des leukopoetischen Systems wurden folgende Werte gefunden (37):

Tabelle 11a: Spezifische Aktivität der Tetrahydrofolat-Formylase in weißen Blutzellen bei Erkrankungen des leukopoetischen Systems

	N	SA: $\mu\text{Mol/h}/10^7$ Zellen
normale periph. Leukoc.	29	22 ± 15
normale Knochenmarkzellen	16	51 ± 26
akute Leukosen		
periph. Zellen	50	135 ± 51
Markzellen	14	137 ± 58
chronische Myelosen		
periph. Zellen	19	95 ± 36
akute Myeloblastenschübe		
bei chron. Myelosen		
periph. Zellen	5	167 ± 57
Lymphadenosen		
periph. Zellen	14	40 ± 20

Die Untersuchungsergebnisse bei Erkrankungen des erythro-poetischen Systems sind in Tab.11b zusammengefaßt.

Tabelle 11b: Spezifische Aktivität der Tetrahydrofolat-Formylase in roten Blutzellen bei Erkrankungen des erythropoetischen Systems

	N	SA: $\mu\text{Mol/h}/10^7$ Zellen
normale Erythrocyten	16	9
hämolytische Anämie	5	34
Sphärocytose	3	26
paroxysmale nächtliche Hämoglobinurie	2	32 (WILMANN (34):24)
Erythroleukämie	1	36

1. Die Aktivität des Formiat-aktivierenden Enzyms in Beziehung zu der LDH, den Reticulocyten und der Erythrocyten-Lebensdauer im peripheren Blut

Zwischen der Aktivität der Lactatdehydrogenase im Serum und der Aktivität der Tetrahydrofolat-Formylase in den Erythrocyten ergab sich keine signifikante Korrelation ($N=56$). Die berechneten Korrelationskoeffizienten sind in Tab.12 aufgeführt.

Tabelle 12: Korrelation zwischen LDH und Tetrahydrofolat-Formylase

LDH - SA/ 10^8 Zellen	$r = 0,1912$	($p > 0,1$)
LDH - SA/mg Protein	$r = 0,0635$	($p > 0,1$)
LDH - SA/mg Hb	$r = 0,1416$	($p > 0,1$)

Zwischen der Erythrocyten-Lebensdauer und der Aktivität der Tetrahydrofolat-Formylase ($N=30$) ergab sich eine Beziehung mit hoher Signifikanz (siehe Tab.13). Die Enzymaktivität war umso höher, je kürzer die Erythrocyten-Lebensdauer war. In allen drei Bezugssystemen ($/10^8$ Zellen; /mg Protein; /mg Hämoglobin) lag die Korrelation innerhalb einer Überschreitungswahrscheinlichkeit von weniger als 0,1%. In Abb.9 sind die Enzymaktivitäten bei 30 Patienten mit unterschiedlicher Lebensdauer der Erythrocyten zusammengestellt.

Tabelle 13: Korrelation der Tetrahydrofolat-Formylase in roten Blutzellen mit der Erythrocyten-Lebensdauer und der Reticulocytenzahl im Blut.
(N = Fallzahl, SA: μ Mol Substratumsatz/h)

Tetrahydrofolat- Formylase	Erythrocyten-Lebensdauer ($T/2$ ^{51}Cr (Tage))		Reticulocyten (%)	
	N = 30		unbehandelte Pat. Gruppe 1: N = 30	behandelte Pat. Gruppe 2: N = 19
	r	p	r	p
SA/ 10^8 Eryth.	0,7568	<0,001	0,6329	0,1305 (>0,1)
SA/mg Prot.	0,6300	<0,001	0,5286	0,2309 (>0,1)
SA/mg Hb	0,7220	<0,001	0,6595	0,2524 (>0,1)

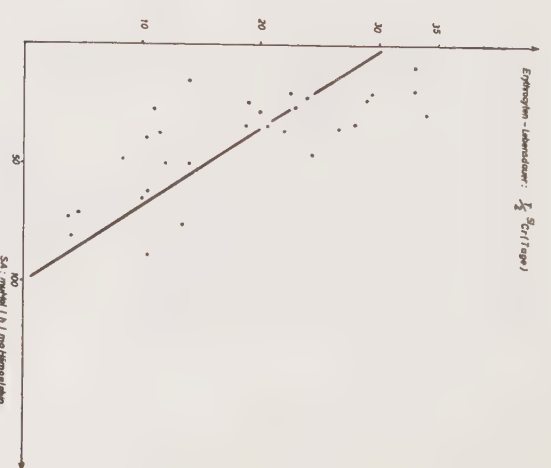
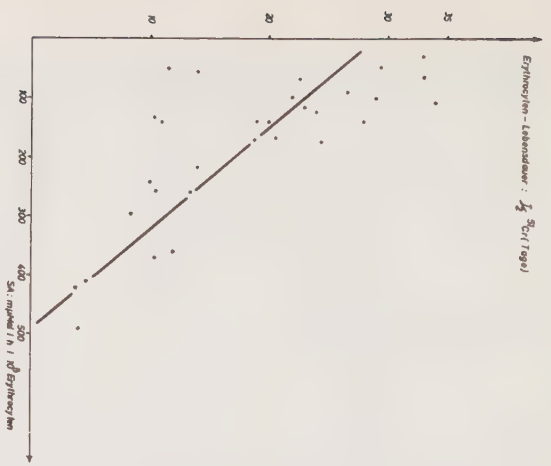


Abb. 9: Beziehung zwischen Erythrocyten-Lebensdauer und der Aktivität der Tetrahydrofolat-Formylase in roten Blutzellen

Die Beziehung zwischen der Reticulocytenzahl im peripheren Blut und der Aktivität der Tetrahydrofolat-Formylase wurde an zwei verschiedenen Kollektiven geprüft.

Gruppe 1:

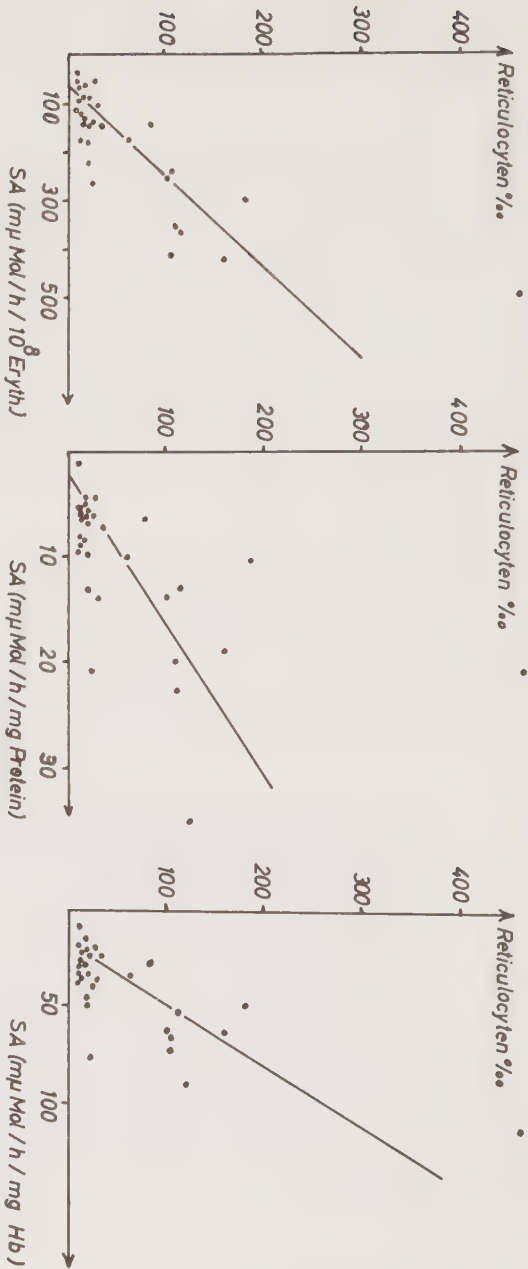
Fälle, die während und einige Zeit vor der Untersuchung unter keiner Therapie standen. Dies sind dieselben Fälle (N=30), die auch bei der Berechnung der Korrelation in Bezug auf die Erythrocyten-Lebensdauer Verwendung fanden. Die Ergebnisse der Gruppe 1 sind in Abb.10 zusammengestellt. Die Enzymaktivität war umso höher, je mehr Reticulocyten im peripheren Blut vorhanden waren. Im Bezug auf die eingesetzte Zellzahl und die Hämoglobinkonzentration in der Enzymlösung lag die Korrelation innerhalb einer Überschreitungswahrscheinlichkeit von 0,1%, im Bezug auf den Proteingehalt innerhalb von 1% (siehe Tab.13).

Gruppe 2:

Diese Untersuchungen wurden durchgeführt, während die Patienten unter einer spezifischen Therapie (z.B. Bluttransfusionen, Corticosteroide, Vitamin B₁₂) standen (N=19). Dabei ergab sich keine signifikante Korrelation zwischen der Reticulocytenzahl und der Aktivität der Tetrahydrofolat-Formylase in roten Blutzellen (siehe Tab.13).

2. Die MICHAELIS-MENTEN-Konstante für l-FH₄ bei der Tetrahydrofolat-Formylase-Reaktion in Beziehung zu der Reticulocytenzahl im peripheren Blut und der Erythrocyten-Lebensdauer

Es wurde die Enzymaktivität in Hämolysaten von Patienten mit verschiedener Erythrocyten-Lebenszeit und unterschiedlichen Reticulocytenwerten untersucht. Die Ergebnisse sind in Abb.11 und 12 zusammengestellt. Es wurden nur Werte verwendet, die gewonnen wurden, solange die betreffenden Patienten unter keiner spezifischen Therapie standen (vergl. Gruppe 1).

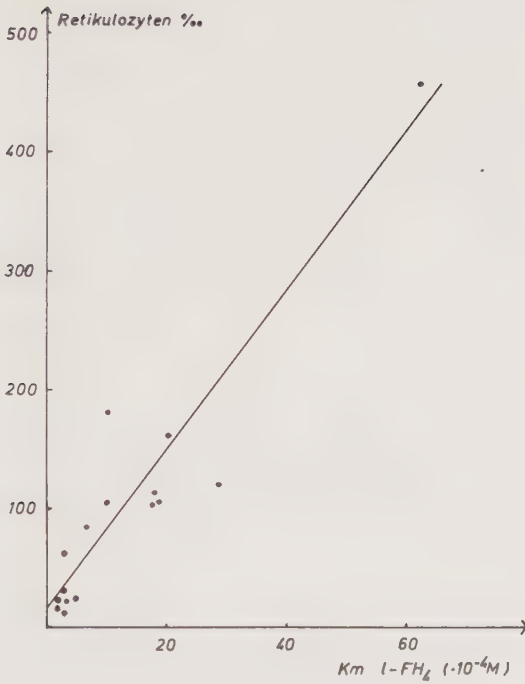


N = 30
 $r = 0,6329$ $p < 0,001$
 Regressionsgerade:
 $y = -23 + 0,46x$

N = 30
 $r = 0,5286$ $p < 0,01$
 Regressionsgerade:
 $y = -11 + 6,5x$

N = 30
 $r = 0,6595$ $p < 0,001$
 Regressionsgerade:
 $y = -51 + 2,8x$

Abb. 10: Beziehung zwischen der Reticulocytenzahl und der Aktivität der Tetrahydrofolat-Formylase in roten Blutzellen

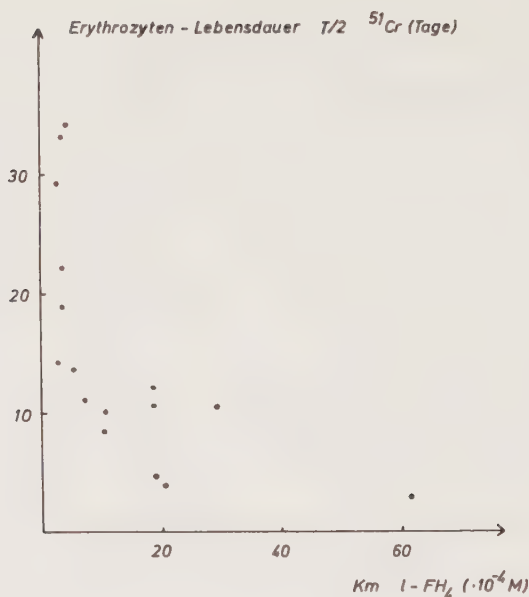


N = 16

r = 0,9229 p < 0,001

Regressionsgerade: $y = 18 + 6,6x$

Abb.11: Beziehung zwischen Reticulocytenzahl und der Km₁-FH₄ bei der Tetrahydrofolat-Formylase in roten Blutzellen



N = 16

r = 0,5929 p < 0,05

Abb.12: Beziehung zwischen der Erythrocyten-Lebensdauer und der Km_{1-FH₄} bei der Tetrahydrofolat-Formylase in roten Blutzellen

Entsprechend den Ergebnissen bei der Aktivität steigt mit der Zunahme der Reticulocytenzahl auch die Km für 1-FH₄ bei der Tetrahydrofolat-Formylase-Reaktion an. Die Korrelation ist bei einer Überschreitungswahrscheinlichkeit von weniger als 0,1% hochsignifikant. Dagegen ist die Zunahme der Km_{1-FH₄} mit der Verkürzung der Erythrocyten-Lebenszeit nicht so deutlich. Hier liegt die Korrelation innerhalb einer Überschreitungswahrscheinlichkeit von 5%. Die folgende Tab.14 zeigt verschiedene Erkrankungen des erythropoetischen Systems, bei denen gleichzeitig mit der

Aktivität des untersuchten Enzyms auch dessen K_m für 1-FH₄ zunimmt.

Tabelle 14: Spezifische Aktivität und K_{m1-FH_4} der Tetrahydrofolat-Formylase bei verschiedenen Erkrankungen des erythropoetischen Systems (*Werte von WILMANN (34))

Diagnose	N	SA: μMol/h/10 ⁸ Zellen	K_{m1-FH_4} (10 ⁻⁴ Mol/Ltr)
normale Erythrocyten	5	90	3
hämolytische Anämie	5	343	20
Sphärocytose	3	261	13
PNH	2	323 (240*)	20 (27*)
Erythroleukämie	1	362	13

Bei Erkrankungen des leukopoetischen Systems wurden entsprechende Ergebnisse gefunden (Tab.15). Auch hier war die Aktivität und gleichzeitig die K_{m1-FH_4} des Enzyms bei solchen Krankheiten erhöht, bei denen die untersuchten Zellpopulationen viel junge Elemente enthielten.

Tabelle 15: Spezifische Aktivität und K_{m1-FH_4} der Tetrahydrofolat-Formylase bei verschiedenen Erkrankungen des leukopoetischen Systems

Diagnose	N	SA: μMol/h/10 ⁷ Zellen	K_{m1-FH_4} (10 ⁻⁴ Mol/Ltr)
Leukocytose bei Herzinfarkt	1	127	5
akute Leukose 79% Paramyeloblasten	1	186	8
Myeloblastenschub bei Osteomyelosklerose	1	452	20
chron. Myelose	1	177	8

3. Eigenschaften des Formiat-aktivierenden Enzyms in Beziehung zum Alter der Erythrocytenpopulationen und der Reticulocytenzahl

Tabelle 13 zeigt, daß die Aktivität des Formiat aktivierenden Enzyms in einem deutlichen Zusammenhang mit der Erythrocyten-Lebensdauer und der Reticulocytenzahl im peripheren Blut steht. Dies gilt aber für die Reticulocyten nur, wenn die Erythrocytenpopulation unter normalen Bedingungen ausgereift ist. Denn bei Gruppe 2 (vergl.S.33), bei der angenommen werden muß, daß die spezifischen Therapeutica die Erythropoese bzw. die Ausschwemmung der Erythrocyten aus dem Knochenmark in irgend einer Weise beeinflussen, besteht keine Abhängigkeit der Enzymaktivität von der Reticulocytenzahl (vergl.Tab.13).

Auch die folgenden Verlaufskontrollen bei drei Patienten zeigen Entwicklungen der Reticulocytenwerte bzw. der Aktivität des Formiat-aktivierenden Enzyms, die völlig unabhängig voneinander sind (Abb.13-15).

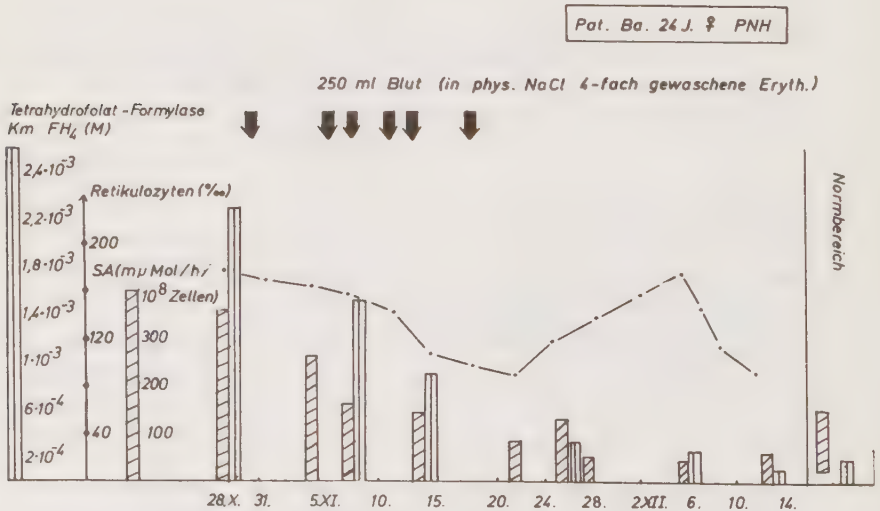


Abb.13: Verlaufskurve einer Patientin mit paroxysmaler nächstlicher Hämoglobinurie

Der Verlauf bei einer Patientin mit paroxysmaler nächtlicher Hämoglobinurie (Abb.13) zeigt, daß nach den Bluttransfusionen die Reticulocytenzahl nur geringgradig und vorübergehend abnahm. Die Aktivität und die K_{m1-FH_4} des Formiat-aktivierenden Enzyms normalisierten sich dagegen vollständig.

Aus der Verlaufskurve einer Patientin mit autoimmunhämolytischer Anämie (COOMBS-Test direkt und indirekt positiv) (Abb.14), die mit Prednisolon behandelt wurde, zeigt trotz deutlichem Abfall der Reticulocyten von 460 auf 140‰ unverändert hohe Werte für die Aktivität und die K_{m1-FH_4} des Enzyms.

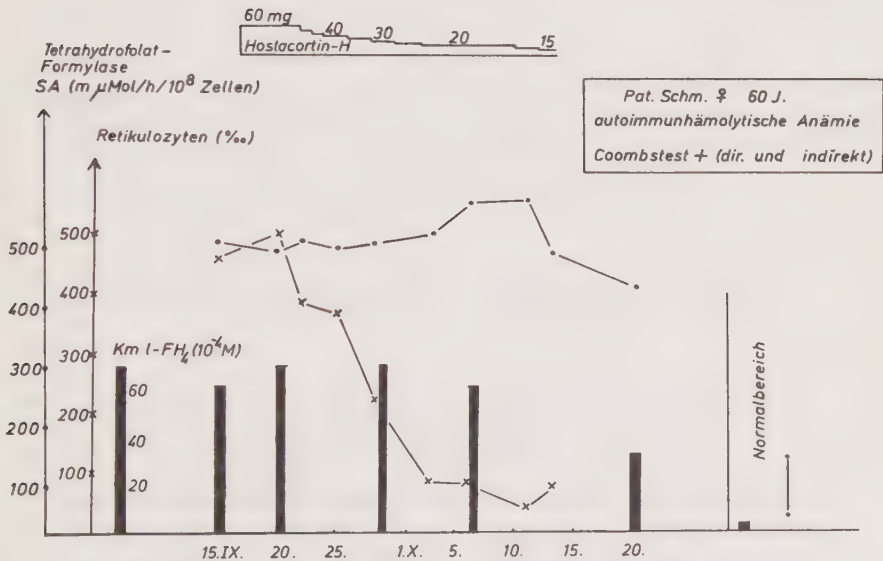


Abb.14: Verlaufskurve einer Patientin mit autoimmunhämolytischer Anämie

Der Fall einer perniziösen Anämie, bei dem eine Stoßtherapie mit 1000 μg Vitamin B₁₂ durchgeführt wurde, zeigt auch nach Abklingen der Reticulocytenkrise keine Abnahme der Enzymaktivität (Abb.15).

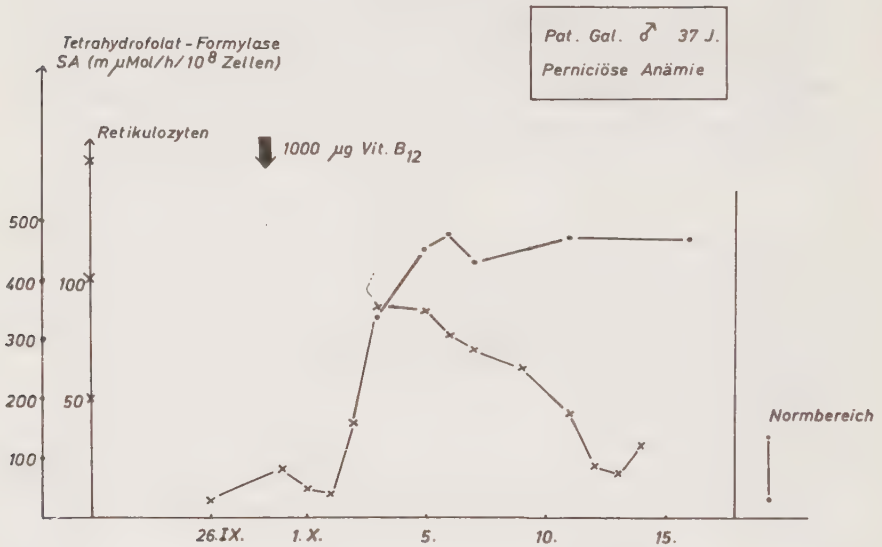


Abb.15: Verlaufskurve eines Patienten mit perniziöser Anämie

4. Enzymatische Formiataktivierung in verschieden alten Erythrocyten beim gleichen Patienten

Die Durchführung dieser Versuche basiert auf Angaben von GARBY und HJELM (14), daß in einer absedimentierten Blutssäule die oberste Erythrocyten-Schicht von jungen Zellen gebildet wird, und daß das Alter der Zellen mit der Tiefe der Schichten zunimmt. Auf Grund dieser Feststellung wurde aus einer in einem langen Reagenzglas sedimentierten

Erythrocytensäule die oberste (nach Verwerfen der Leucocytenschicht), eine mittlere und die unterste Schicht abgetrennt. In jeder Schicht wurde der Reticulocytenanteil, die spezifische Aktivität und die Km_1-FH_4 der Tetrahydrofolat-Formylase bestimmt (Tab.16).

Die Ergebnisse bei einem Gesunden zeigen, daß besonders die auf den Hämoglobingehalt bezogene Aktivität des Enzyms mit der Alterung der Zellen und der Erniedrigung des Reticulocytenanteils in den tieferen Schichten geringgradig abnimmt und die Km_1-FH_4 deutlich zunimmt. Im Gegensatz dazu nimmt mit abnehmender Reticulocytenzahl - wenn es sich um Untersuchungen bei verschiedenen Individuen handelt - die Aktivität und die Km_1-FH_4 des Enzyms ab (Abb. 10 und 11).

Bei der Patientin mit autoimmunhämolytischer Anämie (gleicher Fall wie bei Abb.14) zeigen sich bei hohen Enzymaktivitäten und hohen Km_1-FH_4 Werten nur relativ geringe Schwankungen dieser Werte in den einzelnen Schichten. Das spricht dafür, daß sich in jeder Höhe des Sediments annähernd gleichaltrige und zwar wegen der hohen Aktivität lauter relativ junge Zellen befinden. Das entspricht auch der sehr kurzen mittleren Lebensdauer der Erythrocyten dieser Patienten mit einer ^{51}Cr -Halbwertszeit von nur 4 Tagen.

Tabelle 16: Aktivitäten der Tetrahydrofolat-Formylase in 3 Schichten einer sedimentierten Erythrocytensäule bei einem gesunden und einer Patientin mit autoimmunhämolytischer Anämie

Schichten	gesunde Erythrocytenpopulation (Sa., H., ♂, 23 J.)				autoimmunhämolytische Anämie (Schm., A., ♀, 65 J.)			
	oberste	mittlere	unterste		oberste	mittlere	unterste	
Reticulocyten %	40	25	18		84	55	50	
SA: $\mu\text{Mol/h}/10^8 \text{ Eryth.}$	214	197	188		484	465	451	
$\mu\text{Mol/h/mg Hb}$	42	33	27		90	81	88	
$\text{KM}_{1-\text{FH}_4}$ (10^{-4} Mol/Ltr)	0,9	4,2	3,1		33	38	45	

C. Hemmung der Aktivität der Tetrahydrofolat-Formylase durch den Purinantagonisten 6-Mercaptopurin und den Xanthinoxydasehemmer Allopurinol

Zur Durchführung dieser Versuche wurden den Ansätzen 1,8 μ Mol 6-MP, 2 μ Mol Allopurinol oder beide Substanzen gleichzeitig zugesetzt. Es wurde eine 0,018 bzw. eine 0,02 molare, schwach alkalische Lösung der Hemmstoffe verwendet (pH 8 - 9). Die Konzentrationen von Formiat, d,l-FH₄ und ATP wurden in Ansätzen mit und ohne Zusatz von 6-MP so variiert, wie es zur Ermittlung der Km für diese Substrate auf S.9 beschrieben ist. Dadurch war es möglich, den Einfluß der Hemmstoffe auf die spezifische Aktivität der Tetrahydrofolat-Formylase zu untersuchen und über die graphische Darstellung der Km-Werte (mit und ohne Hemmung) die Art der Hemmung gegenüber den verschiedenen Substraten der Enzymreaktion zu ermitteln.

Die Wirkung von Allopurinol ist in Abb.16 dargestellt. Als Xanthinoxydasehemmer (27,38) verzögert es den Abbau von 6-MP zu 6-Thioharnsäure (12,13,38) und verlängert dadurch die Wirkung des 6-MP auf die Tetrahydrofolat-Formylase. Zur Wirkung von 6-Mercaptopurin siehe S.3 und Abb.1.

1. Beeinflussung der spezifischen Aktivität der Tetrahydrofolat-Formylase durch Allopurinol, 6-MP und durch die Kombination beider Stoffe

In Abb.17 sind die Untersuchungsergebnisse von 5 Patienten mit akuter Leukose zusammengestellt. Sie zeigen, daß die Hemmung durch 6-MP verstärkt wird, wenn gleichzeitig Allopurinol in den Ansatz gegeben wurde. Die Steigerung des Hemmeffektes ist größer, als die Hemmung die durch Allopurinol allein erzielt wird. Es handelt sich also nicht nur um eine einfache Addition der Hemmwirkungen der beiden Stoffe, sondern zusätzlich um einen verstärkten Effekt des 6-MP auf Grund eines verlangsamten Abbaus durch die Xanthinoxydase.

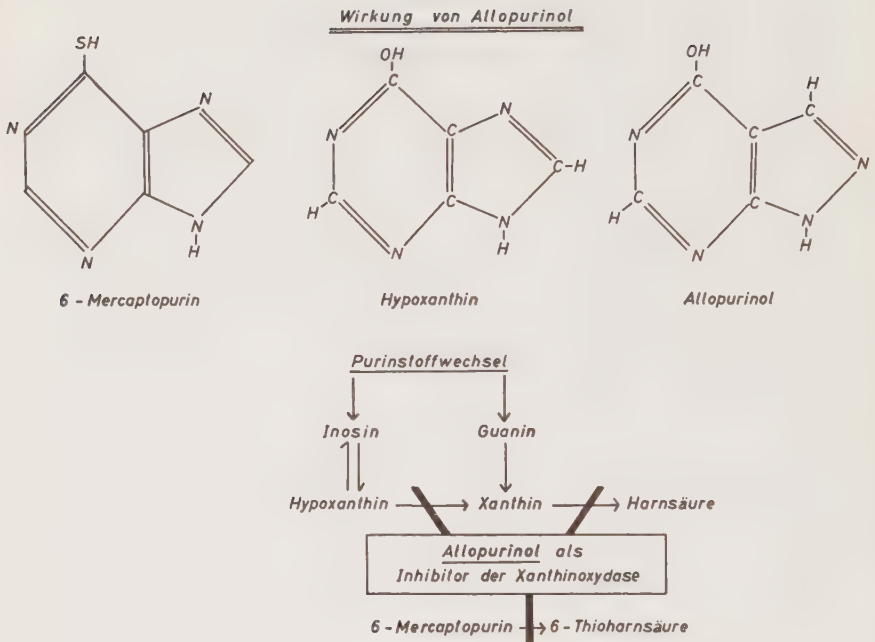
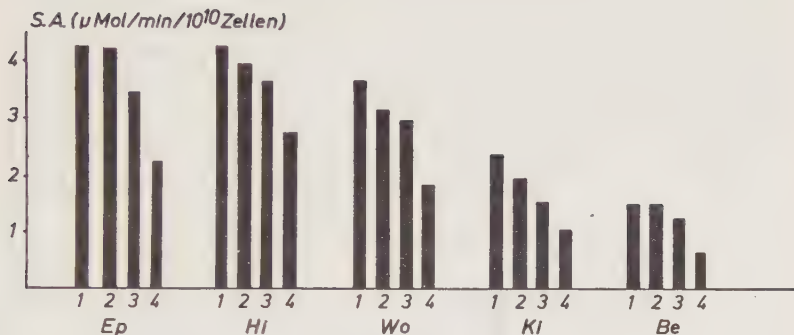


Abb.16: Wirkung von Allopurinol



- 1 = Normalansatz
 2 = mit 2×10^{-3} Mol Allopurinol/Ltr
 3 = mit $1,8 \times 10^{-3}$ Mol 6-MP/Ltr
 4 = mit 2×10^{-3} Mol Allopurinol/Ltr + $1,8 \times 10^{-3}$ Mol 6-MP/Ltr

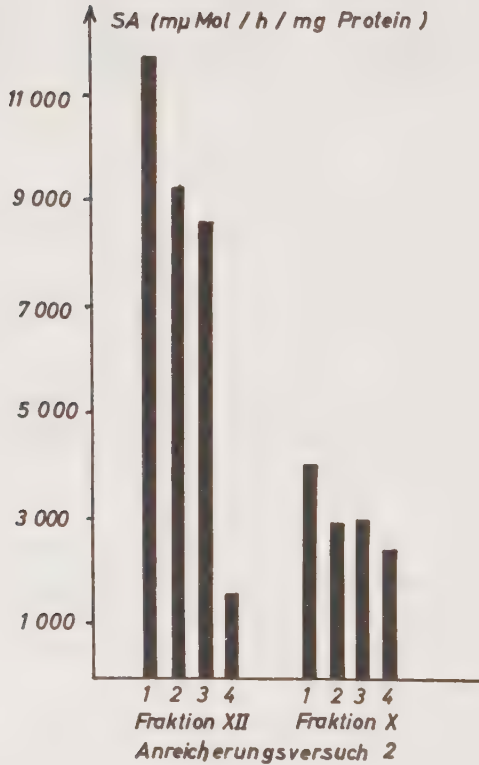
Abb.17: Hemmung der spez. Aktivität der Tetrahydrofolat-Formylase durch Allopurinol und 6-Mercaptopurin in Leukämiezellen

Abb.18 zeigt die entsprechenden Untersuchungen, die an aus Erythrocyten angereichertem Enzym durchgeführt wurden. Verwendung fanden dabei die Fraktionen X und XII aus dem Anreicherungsversuch (vergl. Tab.9, S.27).

Da in der Fraktion XII der Hemmeffekt des 6-MP durch Allopurinol stark zunahm, muß angenommen werden, daß in dieser Fraktion noch Xanthinoxydase vorhanden war, und daß die Tetrahydrofolat-Formylase dieser Fraktion sehr empfindlich gegenüber 6-MP ist.

In der Fraktion X nahm die Hemmung nur um so viel zu, wie es einer Addition des Effektes von 6-MP und Allopurinol entspricht. Die Fraktion X enthält also wahrscheinlich keine Xanthinoxydase mehr. Somit bleibt alles 6-MP über die ganze Inkubationszeit wirksam. Trotzdem ist die Hemmung nicht so ausgeprägt wie in Fraktion XII. Dies deutet

auf eine verminderte Empfindlichkeit der Formyl-FH₄-Synthetase in der Fraktion X gegenüber 6-MP hin.



1 - 4 = wie bei Abb.17

Abb.18: Hemmung der spez. Aktivität der Tetrahydrofolat-Formylase durch Allopurinol und 6-Mercaptopurin in angereichertem Erythrocytenenzym

Auffallend war bei einigen Fällen in Abb.17 und 18 die geringe Hemmung des Formiat-aktivierenden Enzyms schon durch Allopurinol allein. Deshalb wird eine bisher nicht beschriebene direkte Hemmung dieses Enzyms durch Allopurinol vermutet. Dafür sprechen auch die folgenden Hemmversuche in Fraktion X und XII aus Versuch 2 der Enzymanreicherung (vergl. Tab.9, S.27) mit steigenden Allopurinol-Konzentrationen im Ansatz (Abb.19).

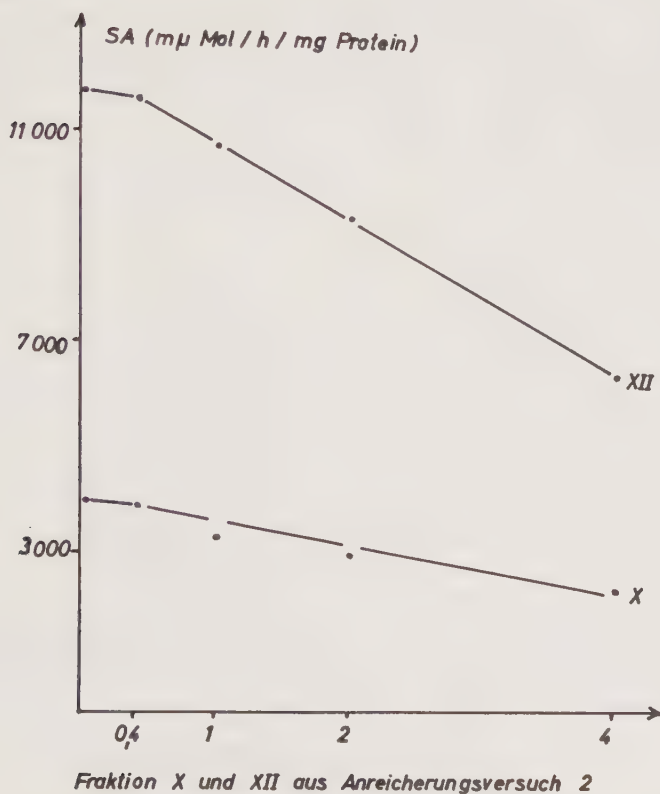


Abb.19: Hemmung der spez. Aktivität der Tetrahydrofolat-Formylase in Erythrocytenenzym mit verschiedenen Allopurinol-Konzentrationen

2. Typen der Hemmung der Tetrahydrofolat-Formylase durch 6-Mercaptopurin gegenüber den 3 Substraten der Enzymreaktion

Ob die Hemmung einer Enzymreaktion durch einen Inhibitor gegenüber einem bestimmten Substrat kompetitiv, nicht kompetitiv oder unkompetitiv ist, läßt sich aus der graphischen Darstellung der K_m -Werte für das Substrat bei verschiedenen Inhibitorkonzentrationen ablesen (11).

Die Versuche zu Abb.20-23 wurden mit Enzym aus Fraktion X des 2. Anreicherungsversuches (vergl. Tab.9, S.27) durchgeführt. Identische Versuche mit der Fraktion XII des 2. Anreicherungsversuches ergaben genau die gleichen Ergebnisse. Gegenüber d,l-FH₄ war die Hemmung durch 6-MP nicht kompetitiv (Abb.20).

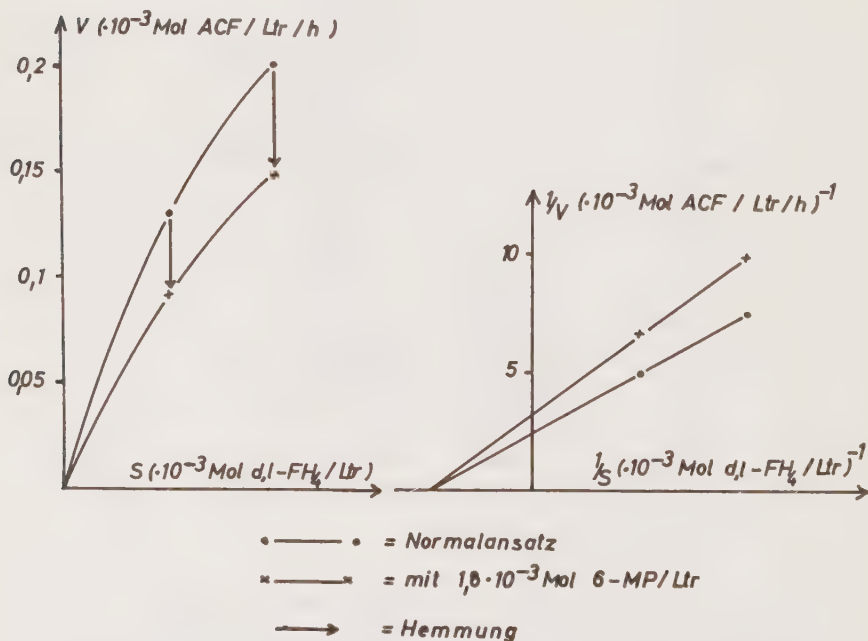


Abb.20: Hemmung der spez. Aktivität der Tetrahydrofolat-Formylase in Erythrocytenenzym durch 6-MP bei verschiedenen d,l-FH₄-Konzentrationen

Gegenüber Formiat war die Hemmung durch 6-MP kompetitiv (Abb.21).

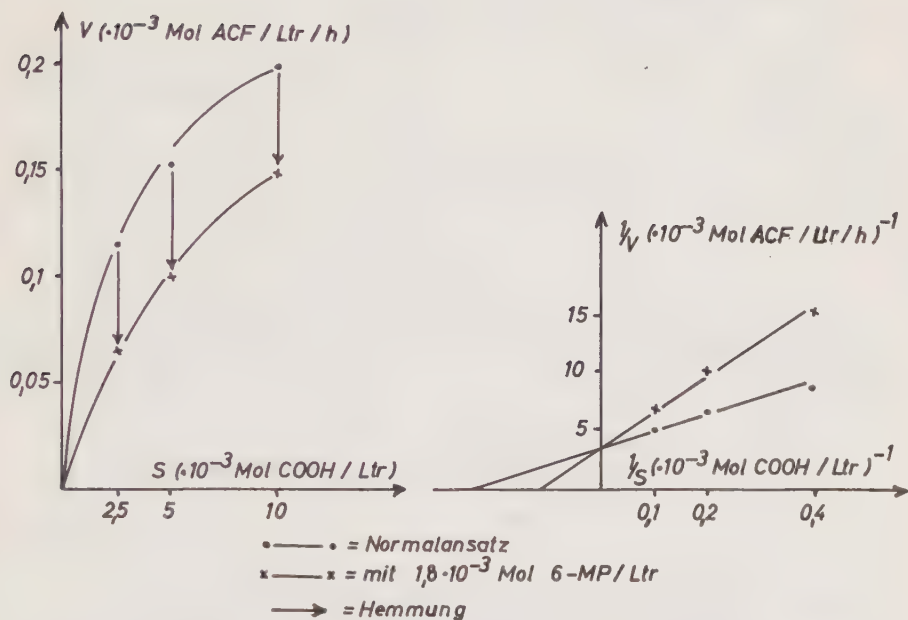


Abb.21: Hemmung der spez. Aktivität der Tetrahydrofolat-formylase in Erythrocytenenzym durch 6-MP bei verschiedenen Formiat-Konzentrationen

Gegenüber ATP fand sich ein Mischtyp der Hemmung durch 6-MP (Abb.22).

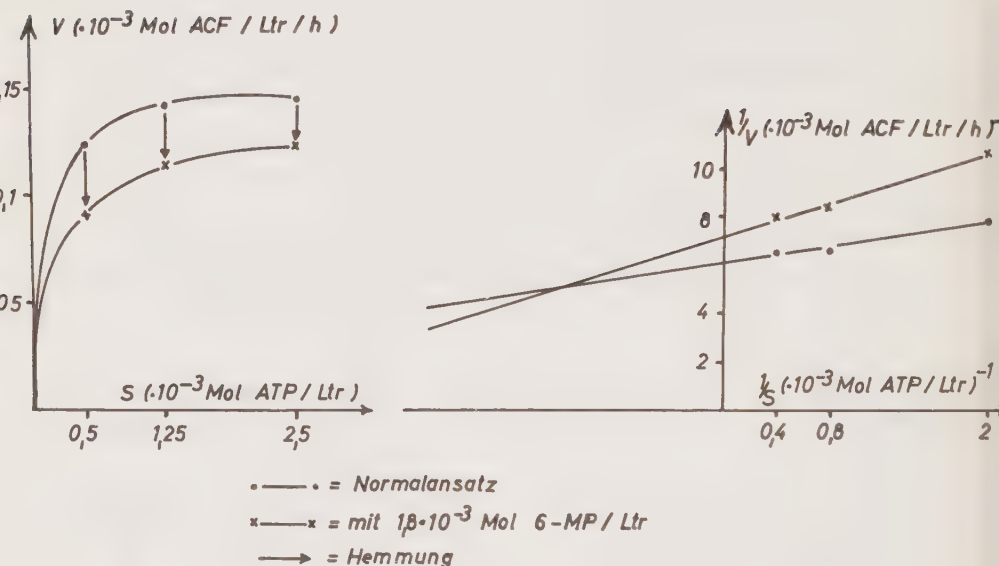


Abb.22: Hemmung der spez. Aktivität der Tetrahydrofolat-Formylase in Erythrocytenenzym durch 6-MP bei verschiedenen ATP-Konzentrationen. Die Ansätze enthielten kein ATP-regenerierendes System (PEP + PK).

Zur näheren Charakterisierung des Mischtyps wurde in einer graphischen Darstellung $1/V$ gegen die Inhibitorkonzentration I bei verschiedenen ATP-Konzentrationen aufgetragen (Abb.23). Da im Schnittpunkt der Geraden $1/V > 0$ ist, nähert sich die Hemmung dem kompetitiven Typus (11).

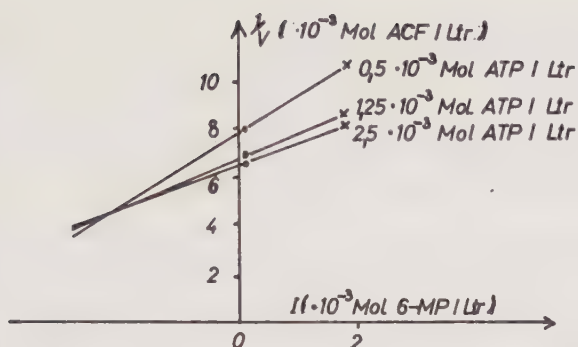


Abb.23: nähere Charakterisierung der Hemmung der spez. Aktivität der Tetrahydrofolat-Formylase in Erythrocytenenzym durch 6-MP bei verschiedenen ATP-Konzentrationen.

Es ergeben sich also folgende Typen der Hemmung der Tetrahydrofolat-Formylase durch 6-MP (Tab.17).

Tabelle 17

Substrat	Typ der Hemmung der Tetrahydrofolat-Formylase-Reaktion durch 6-MP
d,l-FH ₄	nicht kompetitiv
COOH	kompetitiv
ATP	zum kompetitiven Typ neigender Mischtyp

UNGER und SILBER (29) fanden gegenüber FH₄ und Formiat die gleichen Ergebnisse, gegenüber ATP einen reinen kompetitiven Hemmtypus.

IV. Diskussion

=====

Die Ergebnisse über die Aktivität der Tetrahydrofolat-Formylase in Erythrocyten entsprechen grundsätzlich denen bei Untersuchungen an myeloischen Zellen (2,5,16,31,33). Je jünger im Durchschnitt die einzelnen Zellen einer Zellpopulation sind, um so höhere Aktivitäten lassen sich für das Formiat-aktivierende Enzym feststellen.

Allerdings sind die Absolutwerte der Aktivität der Tetrahydrofolat-Formylase in Erythrocyten um ca. eine Zehnerpotenz geringer als in Leukocyten. Dies dürfte damit zusammenhängen, daß die ausgereiften kernlosen Erythrocyten keinen so starken Nukleinsäurestoffwechsel mehr besitzen wie die kernhaltigen Leukocyten. Vielleicht ist der Unterschied auch in der sehr viel längeren Lebensdauer der Erythrocyten begründet.

Im Vergleich zum normalen Hämolysat ist die Aktivität und die K_{m1-FH_4} der Formiataktivierung in reticulocytenreichem Blut deutlich erhöht (Abb.10, Tab.13). Aus der Literatur sind ähnliche Ergebnisse von anderen Enzymen aus Erythrocyten bekannt. ASENSI (1) fand bei Ratten signifikant höhere Aktivitäten in Reticulocyten gegenüber Erythrocyten bei der Hexokinase, Glukose-6-Phosphatdehydrogenase (G-6-PDH), Aldolase, Isocitratdehydrogenase (ICDH) und Malatdehydrogenase (MDH). BARTOS und DESFORGES (2) fanden in menschlichen Erythrocyten die deutlichste Aktivitätsabnahme mit dem Alter der Zellen bei der Erythrocyten-GOT, weniger deutlich bei der Phosphoglyceraldehyddehydrogenase (PGADH) und bei der G-6-PDH. LÖHR und WALLER (19,20) fanden mit zunehmendem Alter menschlicher Erythrocyten die höchsten Inaktivierungsgeschwindigkeiten für G-6-PDH und PGADH. RAPOPORT (26) fand eine deutlich geringere Aktivität der Hexokinase, G-6-PDH und PGADH in alten Erythrocyten gegenüber Reticulocyten.

Die Aktivitätsabnahme der Tetrahydrofolat-Formylase mit dem Alter der Erythrocyten geht aber nicht immer parallel mit der Reticulocytenzahl. Das zeigt die fehlende Korrelation zwischen Reticulocytenzahl und Enzymaktivität bei Patienten, die unter einer spezifischen Behandlung standen (Gruppe 2 S.33, Tab.13).

Drei Verlaufskurven zeigen diese unabhängige Entwicklung von Reticulocytenzahl und Formiataktivierung besonders deutlich.

Unter Transfusionsbehandlung einer Patientin mit paroxysmaler nächtlicher Hämoglobinurie (Abb.13) nimmt die Enzymaktivität und die Km_{1-PH_4} allein als Folge der Durchmischung mit normalen Spendererythrocyten bis zum Normalbereich ab, während die Reticulocytenzahl immer hoch pathologisch bleibt.

Bei einem raschen Reticulocytenabfall nach Beginn einer Prednisolonbehandlung bei autoimmunhämolytischer Anämie (Abb.14) bleiben die Enzymaktivität und die Km_{1-PH_4} zunächst unverändert hoch, da sich das mittlere Alter der Erythrocytenpopulation nicht mit der gleichen Geschwindigkeit ändert.

Die auf dem Höhepunkt einer Reticulocytenkrise einer mit Vitamin B_{12} behandelten perniziösen Anämie (Abb.15) stark erhöhte Aktivität der Tetrahydrofolat-Formylase bleibt auch nach Abfall der Reticulocyten zur Norm noch unverändert bestehen. Es sind plötzlich viele Reticulocyten aus dem Knochenmark ausgeschwemmt worden, die bald ihre charakteristische Struktur verloren haben, aber doch für ein relativ junges Durchschnittsalter der Erythrocyten dieses Patienten verantwortlich bleiben. Dieser Verlauf entspricht Untersuchungen von BOCK und Mitarb. (6) an megaloblastären Anämien, bei denen die untersuchten Enzyme der Glykolyse noch lange Zeit nach Abklingen der Reticulocytenkrise eine erhöhte Aktivität aufwiesen.

Es wird also gezeigt, daß die Aktivität des Formiat-aktivierenden Enzyms vom mittleren Alter aller Erythrocyten

abhängig ist und nicht von dem momentan im peripheren Blut nachweisbaren Reticulocytenanteil. Das gleiche gilt in weniger ausgeprägtem Maße auch für die Km_1 - FH_4 .

Als Maßstab für das mittlere Alter einer Erythrocytenpopulation kann deshalb die Reticulocytenzahl nur verwendet werden, wenn die Population ungestört, d.h. ohne den Einfluß einer spezifischen Therapie, herangewachsen ist.

Es ist besser das Alter einer Erythrocytenpopulation nach der mittleren Lebensdauer der einzelnen Zellen zu beurteilen, da hier in jedem Falle ein gesicherter Zusammenhang besteht (Abb.9, Tab.13).

Daraus ergibt sich, daß aus der Aktivität der Tetrahydrofolat-Formylase nur bedingt auf die Reticulocytenzahl geschlossen werden kann (Abb.10). Dagegen läßt sich das mittlere Alter der untersuchten Erythrocytenpopulation sicherer abschätzen (Abb.9). Aus den Km_1 - FH_4 -Werten läßt sich auf die Reticulocytenzahl auch nur schließen, wenn der untersuchte Patient unter keiner spezifischen Therapie stand. Allerdings dürften die Vorhersagen unter diesen Voraussetzungen dann sehr genau ausfallen (Abb.11). Der Rückschluß von den Km_1 - FH_4 -Werten auf die mittlere Erythrocyten-Lebensdauer ist zu ungenau (Abb.12).

Die Anreicherung des Formiat-aktivierenden Enzyms aus Hämolysat einer Patientin mit autoimmunhämolytischer Anämie konnte das Vorhandensein eines Isoenzym der Tetrahydrofolat-Formylase wahrscheinlich machen (Tab.9). Die hohe Enzymaktivität bei hoher Km für 1- FH_4 in Fraktion XII gegenüber einer hohen Enzymaktivität bei normaler Km für 1- FH_4 in den Fraktionen VIII und X führte zu dieser Annahme. Auch die unterschiedliche Beeinflussbarkeit der Enzymfraktionen X und XII durch 6-MP und Allopurinol (Abb. 18 u.19) bedeutet einen Hinweis, daß die Enzyme dieser beiden Fraktionen nicht identisch sind. Vielleicht handelt es sich hier um ein pathologisches Enzym in den erkrankten Erythrocyten oder um ein physiologisches Isoenzym, das in Reticulocyten noch nachweisbar ist und dann schnell an

Aktivität verliert. Dieses physiologische Isoenzym würde den mit der Zunahme der Reticulocytenzahl festgestellten Anstieg von Aktivität und $K_{m1}\text{-FH}_4$ des Formiat-aktivierenden Enzyms erklären. Der endgültige Nachweis des Isoenzym steht noch aus. Es wäre zu versuchen, ob sich durch chromatographische Methoden zwei verschiedene Isoenzyme der Tetrahydrofolat-Formylase aus einem sehr aktiven HämolySAT abtrennen lassen.

Anders sind die Ergebnisse, wenn aus Erythrocyten des gleichen Spenders verschieden alte Populationen isoliert werden (Tab.17). Man findet eine Erniedrigung der Aktivität der Tetrahydrofolat-Formylase mit abnehmenden Reticulocytenzahlen bei gleichzeitiger Erhöhung der K_m für 1-FH_4 . Dies könnte durch eine Zunahme des ADP-Gehaltes in den älteren Zellen erklärt werden. Denn nach JOYCE und HIMES (18) hemmt ADP die enzymatische Formiataktivierung kompetitiv zu ATP. Auch Tab.10 zeigt eine Hemmung der Tetrahydrofolat-Formylase durch ADP. Allerdings wurden in diesem Versuch unphysiologisch hohe ADP-Konzentrationen verwendet.

Eine Zunahme des ADP-Gehaltes in alternden Erythrocyten bei gleichzeitiger Aktivitätsabnahme der Enzyme Phosphoglyceraldehyddehydrogenase (PAGDH) und Glukose-6-Phosphatdehydrogenase (G-6-PDH) wurde bereits 1958 von LÖHR und WALLER beschrieben (19). Nach diesen Autoren nimmt die ADP-Konzentration in intravital gealterten Erythrocyten von 1,9 auf $5,5 \times 10^{-4}$ Mol/Ltr zu. Die Erhöhung der intrazellulären ADP-Konzentration um $3,6 \times 10^{-4}$ Mol/Ltr liegt demnach im Bereich der von JOYCE und HIMES (18) mit 2,7 bis $4,4 \times 10^{-4}$ Mol/Ltr angegebenen K_1 für ADP bei der Tetrahydrofolat-Formylase-Reaktion.

Die Hemmversuche an Leukocytenenzym und gereinigtem Erythrocytenenzym mit Allopurinol führten zu dem interessanten Nebenbefund, daß die Aktivität der Tetrahydrofolat-Formylase schon durch Allopurinol alleine gering gehemmt wird (Abb.19). SKIPPER und Mitarb. (28) schreiben dem Allopu-

rinol allerdings keine tumorhemmende Wirkung zu. Deshalb müßte der direkte Einfluß des Allopurinols auf die Aktivität des Formiat-aktivierenden Enzyms noch genauer untersucht werden. Die indirekte Wirkung des Allopurinols auf die Aktivität dieses Enzyms konnte durch in vitro Versuche bestätigt werden. Die aus der Klinik bekannte stärkere cytostatische Wirkung des 6-Mercaptopurins bei gleichzeitiger Gabe von Allopurinol (12,13) beruht auf einer längeren Wirkdauer von 6-MP, wenn die Xanthinoxidase durch Allopurinol blockiert ist. Daß die Steigerung der Hemmung nicht nur auf einer Addition der Hemmwirkung der beiden Inhibitoren beruht, wird aus Abb.17 und Abb.18 (XII) deutlich.

Die Hemmung der Tetrahydrofolat-Formylase durch 6-Mercaptopurin ist gegenüber Formiat kompetitiv, gegenüber ATP annähernd kompetitiv und gegenüber $d,l-FH_4$ nicht kompetitiv. Daraus ergibt sich, daß die Konzentrationen von Formiat und ATP in den Zellen einen Einfluß auf die Größe der Hemmwirkung des 6-MP haben. Wenn man annimmt, daß der Zelle unbegrenzt Formyl-Donatoren zur Verfügung stehen, wird die ATP-Konzentration in der Zelle ein bedeutender Faktor für die Empfindlichkeit der Zellen gegenüber 6-MP. Somit dürften junge Erythrocyten, die nach LÖHR und WALLER (19, 20) noch einen ausreichenden glykolytischen Stoffwechsel haben und ihren ATP-Gehalt konstant halten können, weniger empfindlich gegenüber 6-MP sein als alte Erythrocyten mit niedrigerem ATP-Gehalt.

V. Zusammenfassung

=====

Das Formiat-aktivierende Enzym nimmt eine wichtige Stellung in der de novo-Synthese von Purinkörpern und damit der Nucleinsäuren ein. Nach einer ausführlichen Beschreibung der Methodik werden die Eigenschaften des Enzyms in normalen Erythrocyten untersucht. Dabei findet sich eine vom pH des Mediums in weiten Bereichen unabhängige Aktivität, deren Normalbereich mit $3 - 15 \text{ mpMol/h}/10^7 \text{ Zellen}$ angegeben wird.

Die MICHAELIS-Konstanten für die einzelnen Substrate betragen in Erythrocytenenzym für ATP $4,6 \times 10^{-4} \text{ Mol/Ltr}$, für COOH $2,5 \times 10^{-3} \text{ Mol/Ltr}$, für 1-FH_4 $3 \times 10^{-4} \text{ Mol/Ltr}$.

Ein Fraktionierungsversuch des Erythrocytenenzym mit Ammoniumsulfat weist möglicherweise auf ein Isoenzym der Tetrahydrofolat-Formylase in Reticulocyten und sehr jungen Erythrocyten hin. Mit einer Erhöhung der Reticulocytenzahl und einer Verkürzung der Erythrocyten-Lebenszeit nimmt die Aktivität wie auch die $K_{m1\text{-FH}_4}$ des Enzyms zu. Es wird gezeigt, daß sich aus der Höhe der Aktivität mit ziemlicher Genauigkeit das mittlere Alter der Erythrocytenpopulation abschätzen läßt. Die Aktivität korreliert aber nicht mit der Reticulocytenzahl im peripheren Blut, wenn die Patienten während der Untersuchung unter einer spezifischen Therapie standen.

Bei verschieden alten Erythrocyten desselben Patienten nimmt die Aktivität mit dem Alter ab, die $K_{m1\text{-FH}_4}$ nimmt zu. Eine Hemmung des Enzyms durch in alten Erythrocyten anfallendes ADP wird angenommen.

Hemmversuche mit 6-MP zeigen eine kompetitive Hemmung gegenüber Formiat, eine annähernd kompetitive gegenüber ATP und eine nicht kompetitive gegenüber $d,1\text{-FH}_4$.

Die Inhibitorwirkung durch 6-MP wird durch Allopurinol in zweifacher Weise verstärkt. Einmal führt die Blockierung der Xanthinoxidase durch Allopurinol zu einem verlangsamt

ten Abbau von 6-MP. Auf der anderen Seite addiert sich eine geringe direkte Hemmwirkung des Allopurinols auf die Tetrahydrofolat-Formylase zu der Inhibitorwirkung des 6-MP.

VI. Abkürzungsverzeichnis

=====

ACF	=	Anhydrocitrovorum-Faktor
AICR	=	4-Amido-5-imidazol-carboxamid-Ribotid
AMP	=	Adenosinmonophosphat
ADP	=	Adenosindiphosphat
ATP	=	Adosintriphosphat
"C ₁ "	=	Einkohlenstoffeinheit
FAICR	=	4-Formamido-5-imidazol-carboxamid-Ribotid
FH ₂	=	Dihydrofolsäure
FH ₄	=	Tetrahydrofolsäure
GMP	=	Guanosinmonophosphat
Hb	=	Hämoglobin
IMP	=	Inosinmonophosphat
Km	=	MICHAELIS-MENTEN-Konstante
LDH	=	Lactatdehydrogenase
NADP(H)	=	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotidphosphat (reduziert)
Pa	=	anorganisches Phosphat
PEP	=	Phosphoenlpyruvat
PNH	=	paroxysmale nächtliche Hämoglobinurie
PK	=	Pyruvat-Kinase
SA	=	spezifische Aktivität
6-MP	=	6-Mercaptopurin

VII. Literaturverzeichnis

1. ASENSI, F. Vergleichende Untersuchungen über Kohlenhydratstoffwechsel in den Erythrocyten gesunder Ratten und in den Reticulocyten bei Phenylhydrazinanämie.
Z.ges.exp.Med. 147, S.154-172 (1968)
2. BARTOS, H.R. und J.F.DESFORGES: Enzymes as erythrocyte age reference standarts.
Amer.J.med.Sci. 254, S.862-865 (1967)
3. BERTINO, J.R., A.ALENTY, B.W.GABRIO und F.M.HUENNECKENS: Folic acid coencymes and one carbon metabolism in leucocytes.
Clin.Res.Proc. 8, S.206 (1960)
4. BERTINO, J.R., B.SIMMONS und D.M.DONOHUE: Purification and properties of the formiate-activating enzyme from erythrocytes.
J.biol.Chem. 237, S.1314-1318 (1952)
5. BERTINO, J.R., R.SILBER, M.FREEMAN, A.ALENTY, A.ALBRECHT, B.W.GABRIO und F.M.HUENNECKENS: Studies on normal and leucemic leucocytes. IV. Tetrahydrofolate-dependent enzymes and dihydrofolic reductase.
J.clin.Invest. 42, S.1899-1907 (1963)
6. BOCK, H.E., F.W.ALY, W.L.CASTRILLÓN-OBERNDORFER, M.EGGSTEIN, CH.FRÖHLICH, J.HARTJE, G.W.LOHR, D.MÜLLER, K.SEYNSCHE, D.VOSS, H.D.WALLER und W.WILMANN: Verlaufsstudien an megaloblastären Anämien unter Vitamin B₁₂-Behandlung.
Klin.Wschr. 45, S.169-176 (1967)
7. BROCKMANN, R.W. und S.CHUMLEY: Inhibition of formylglycinamide synthesis in neoplastic cells by purines and analogs.
Biochim.biophys.Acta (Amst.) 95, S.365-379 (1965)
8. BÜCHER, T. Über ein phosphatübertragendes Gärungsferment.
Biochim.biophys.Acta (Amst.) 1, S.292-314 (1948)

9. BUSCH, D. und K.PELZ: Erythrocytenisolierung aus Blut mit Baumwolle.
Klin.Wschr. 44, S.983-984 (1966)
10. CAVALLI-SFORZA, L.: Grundbegriffe der Biometrie.
S.85-86 und S.92-95, G.Fischer-Verlag Stuttgart (1964)
11. DOCUMENTA GEIGY Wissenschaftliche Tabellen.
6.Auflage (1960), S.61 und S.362-364
12. ELION, G.B., S.CALLAHAN, R.W.RUNDLES und G.H.HITCHINGS: Relationship between metabolic fates and antitumor activities of thiopurines.
Cancer Res. 23, S.1207-1217 (1963)
13. FREY-WETTSTEIN, M., G.PEDIO und K.GIGER: Zur Verhütung von Harnsäureschäden bei cyto-statischer Behandlung von Leukosen.
Schweiz.med.Wschr. 97, S.148-151 (1967)
14. GARBY, L. und M.HJELM: Ultracentrifugal fractionation of human erythrocytes with respect to cell age.
Blut II, 9, S.284-291 (1963)
15. GREENBERG, G.R., L.JAENICKE und M.SILVERMANN: On the occurrence of N₁₀-formyl-tetrahydrofolic acid by enzymic formylation of tetrahydrofolic acid and on the mechanism of this reaction.
Biochim.biophys.Acta (Amst.) 17, S.589-591 (1955)
16. GRIGNANI, F., M.MARTELLI und A.COLONNA: Alcune osservazioni sul compartamento degli enzimi del pool teraidrofolato nelle cellule ematiche.
Haematologica 48, S.613-634 (1963)
17. JAENICKE, L. und E.BRODE: Untersuchungen über Einkohlenstoffkörper. I. Die Tetrahydrofolatformylase aus Taubenleber. Reinigung und Mechanismus.
Biochem.Z. 334, S.108-132 (1961)
18. JOYCE, B.K. und R.H.HIMES: Formyltetrahydrofolate synthetase.
J.biol.Chem. 241, S.5716-5731 (1966)

19. LÖHR, G.W., H.D.WALLER, O.KARGES, B.SCHLEGEL und A.A. MÜLLER: Zur Biochemie der Alterung menschlicher Erythrocyten. Klin.Wschr. 36, S.1008-1013 (1958)
20. LÖHR, G.W. und H.D.WALLER: Zur Biochemie der Erythrocytenalterung. Folia haemat. (Lpz.) 78, S.385-402 (1961/62)
21. Mc COLLISTER, R.J., W.R.GILBERT, jr. und J.B.WYNGAARDEN: Pseudofeedback inhibition of purine synthesis by 6-Mercaptopurine and other analogs. J.clin.Invest. 41, S.1383 (1962)
22. Mc COLLISTER, R.J., W.R.GILBERT, jr., D.M.ASHTON und J.B.WYNGAARDEN: Pseudofeedback inhibition of purine synthesis by 6-Mercaptopurine ribonucleotide and other purine analogs. J.biol.Chem. 239, S.1560-1563 (1964)
23. O'DELL, B.L., J.M.VANDENEBELT, E.S.BLOOM und J.J. PFIFFNER: Hydrogenation of Vitamin B₆ (pteroylglutamic acid) and related pteridines. J.amer.chem.Soc. 69, S.250-253 (1947)
24. RABINOWITZ, J.C. und W.E.PRICER jr.: Crystallization of tetrahydrofolic formylase. Fed.Proc. 17, S.239 (1958)
25. RABINOWITZ, J.C. und W.E.PRICER jr.: Formyltetrahydrofolate Synthetase. J.biol.Chem. 237, S.2898-2902 (1962)
26. RAPOPORT, S. Reifung und Altersvorgänge in Erythrocyten. Folia haemat. (Lpz.) 78, S.364-381 (1961/62)
27. RUNDLES, R.W., E.N.METZ und H.R.SILBERMAN: Allopurinol and the treatment of gout. Ann.Int.Med. 64, S.229-258 (1966)
28. SKIPPER, H.E., R.K.ROBINS, J.R.THOMSON, C.C.CHENG, R.W.BROCKMANN und F.M.SCHABEL jr.: Structure-activity relationships observed on screening a series of pyrazolopyrimidines against experimental neoplasmas. Cancer Res. 17, S.579-596 (1957)

29. UNGER, K.W. und R.SILBER: Studies in the formiate-activating enzyme: Kinetics of 6-Mercaptopurine inhibition and stabilisation of the enzyme. Biochim.biophys.Acta (Amst.) 89, S.167-169 (1964)
30. WHITELEY, H.R., H.J.OSBORN und F.M.HUENNECKENS: Purification and properties of the formiate-activating enzyme from Micrococcus aerogenes. J.biol.Chem. 234, S.1538-1543 (1959)
31. WILMANN, W. Die tetrahydrofolsäure-abhängige Aktivierung von Einkohlenstoffeinheiten in normalen und pathologischen weißen Blutzellen. Klin.Wschr. 39, S.884-888 (1961)
32. WILMANN, W. Zum Wirkungsmechanismus von 6-Mercaptopurin. Klin.Wschr. 40, S.1170-1171 (1962)
33. WILMANN, W. und L.JAENICKE: Bedeutung des Folsäurestoffwechsels für die normale und pathologische Reifung von Blutzellen. Klin.Wschr. 41, S.1077-1082 (1963)
34. WILMANN, W. Paroxysmale nächtliche Hämoglobinurie. Med.Welt. 17, S.2043-2050 (1966)
35. WILMANN, W. Die Thymidin-Kinase in normalen und leukämischen myeloischen Zellen. Klin.Wschr. 45, S.501-511 (1967)
36. WILMANN, W. Folatenzyme und Thymidylat-Synthetase in Erythrocyten und Knochenmarkszellen unter normalen und pathologischen Bedingungen. Folia haemat. 89, 2, S.216-227 (1968)
37. WILMANN, W. Formiat-Aktivierung und de novo Synthese von Purinnucleotiden in Leukämiezellen und ihre therapeutische Beeinflussung durch 6-Mercaptopurin. Z.ges.exp.Med. 147, S.154-172 (1968)
38. ZÖLLNER, N. und M.SCHATTENKIRCHNER: Allopurinol bei der Behandlung der Gicht und der Harnsäure-Nephrolithiasis. Dtsch.med.Wschr. 92, S.654-660 (1964)

Lebenslauf

Am 22.12.1944 wurde ich, Hansjörg Sauer, als zweiter von drei Söhnen des praktischen Arztes Dr. med. Kurt Sauer und seiner Ehefrau Dr. med. Gertrud Sauer, geb. Weiss, in Tübingen geboren.

1947 verzog unsere Familie nach Rottenburg am Neckar. Dort trat ich im Herbst 1950 in die ev. Volksschule ein. Von 1954 bis 1963 besuchte ich das Eugen-Bolz-Gymnasium in Rottenburg.

Nach dem Abitur begann ich im Sommersemester 1963 in Tübingen das Studium der Medizin. Im Frühjahr 1964 bestand ich dort das Vorphysikum und im Herbst 1965 das Physikum. Nach einem klinischen Semester in Wien studierte ich weitere 5 klinische Semester in Tübingen, wo ich dann im Winter 1968/69 das medizinische Staatsexamen ablegte.

